ISOLIERUNG, STRUKTURAUFKLÄRUNG UND PARTIALSYNTHESE EINES ALKALOIDS AUS SENECIO FUCHSII

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HELMUT WIEDENFELD
aus
KÖLN - WEIDEN

BONN 1976

ISOLIERUNG, STRUKTURAUFKLÄRUNG UND PARTIALSYNTHESE EINES ALKALOIDS AUS SENECIO FUCHSII

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HELMUT WIEDENFELD

aus

KÖLN - WEIDEN

BONN 1976

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. E. R ö d e r
2. Referent: Prof. Dr. H. J. R o t h

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 1976

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Für Gerda
und meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0010

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	6
	1.1. Geschichtlicher Überblick	6
	1.2. Chemische Aspekte	8
	1.3. Pharmakologische Aspekte	15
	1.4. Problemstellung	18
2.	Extraktion und Isolierung	21
	2.1. Klassifizierung der Inhaltsstoffe auf dünnschichtchromatographischem Weg	21
	2.2. Extraktion	25
	2.3. Trennung und Isolierung	27
	2.3.1. Säulenchromatographie	27
	2.3.2. Dünnschichtchromatographie	28
	2.3.3. Trockensäulenchromatographie	3o
	2.3.4. Dickschichtchromatographie	31
	2.3.5. Dampfprogrammierte präparative Dünnschichtchromatographie	32
	2.3.6. Gaschromatographie	34
3.	Strukturaufklärung	41
	3.1. Necin	42
	3.2. Necinsäure	48
	3.3. Alkaloid	55
4.	Synthese	6o
5.	Analytik	68
	5.1. Untersuchung von Handelspräparaten	7o
6.	Zusammenfassung	75
7.	Experimenteller Teil	76
	7.1. Allgemeine Angaben	76
	7.2. Spezielle Angaben	78
	7.3. Beschreibung der Versuche zu 4.	81
8.	Literaturverzeichnis	95
9.	Lebenslauf	1oo

1. Einleitung

1.1. Geschichtlicher Überblick

Die Gattung Senecio - Kreuzkraut - aus der Familie der Asteraceen umfaßt etwa 1.2oo beschriebene Arten.

Viele von ihnen werden seit dem Mittelalter als Heilmittel in Form von wässrigen oder alkoholischen Extrakten in der Humanmedizin verwendet.

Als wichtiges Wundmittel wurden sie schon in den Pharmakopöen von Straßburg 1571, Freiburg 16o7 und Mannheim 1764 genannt. Dort wurden sie unter dem Sammelbegriff "Herba consolidae sarracenicae" geführt[1].

Spezielle Senecioarten fanden darüber hinaus bis in die Gegenwart als Diuretika, Antidiabetika und in der Gynäkologie bei funktionellen Blutungen Verwendung[2].

Dabei traten jedoch besonders bei Dauergebrauch Vergiftungserscheinungen auf. Diese Nebenwirkungen wurden schon seit langem in Amerika, Afrika und Australien beobachtet.

Es war daher naheliegend, die wirksamen Bestandteile dieser Drogen zu isolieren, um ihre chemische Struktur und ihre pharmakologische Wirkung aufzuklären.

Besondersseit Mitte der vierziger Jahre wurden die Inhaltsstoffe der meisten Kreuzkrautarten identifiziert. Dabei erkannte man, daß diese Wirkstoffe zur Gruppe der Pyrrolizidinalkaloide gehören.

Diese Alkaloidgruppe ist nicht nur auf die Gattung Senecio beschränkt, sondern man findet sie auch in Vertretern der verschiedensten Pflanzenfamilien wieder:

---

1) A. Müller, Heil- und Gewürzpflanzen, 7, 1 (1924)
Chem. Zentralbl., II, 1o49 (1925)

2) B. Manstein, Zentralbl. Gynaekol., 42, 1672 (1953)

Es sind dies die Mimosaceen, Caesalpiniaceen, Fabaceen, Rhizophoraceen, Santalaceen, Sapotaceen, Borraginaceen, Cichoriaceen, Orchidaceen und Poaceen.

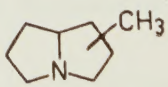
Bis heute sind etwa 12o Pyrrolizidinalkaloide in der Literatur beschrieben worden.

1.2. Chemische Aspekte

Die ersten genauen Merkmale über die Struktur der Pyrrolizidinalkaloide verdankt man MENSCHIKOV, der aus Heliotropium lasiocarpium das Alkaloid Heliotrin isolierte[3]. Er hydrolisierte es und bewies, daß der Grundkörper - von ihm Heliotridin genannt - zwei Hydroxylgruppen, ein tertiäres Stickstoffatom und eine Doppelbindung besitzt. Er hydrierte die Doppelbindung, ersetzte die Hydroxylgruppen durch Wasserstoff und erhielt so eine Base, die er als 1-Heliotridan bezeichnete.

BARGER isolierte als Senecio retrorsus die Base Retronecin, die dieselbe Summenformel wie Heliotridin besitzt, chemisch jedoch nur ähnlich reagiert[4]. Hierbei handelt es sich um Stereoisomere.

Aus Senecio platyphyllos wurde von OREKHOV und LIEDEBEL Platynecin isoliert, dasnach Abbau ebenfalls 1-Heliotridan liefert[5]. MENSCHIKOV erkannte, daß die Struktur dieses Abbauproduktes von entscheidender Wichtigkeit sein mußte, da es aus allen drei bis dahin bekannten Aminoalkoholen entstand. Er entschied sich für ein damals noch unbekanntes Methylpyrrolizidin:

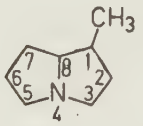


3) G. P. Menschikov, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 65, 974 (1932)
4) G. Barger, T. R. Sashadri, H. E. Watt und T. Yabuta, J. Chem. Soc., 1935, 11
5) A. Orekhov und D. Liedebel, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 68, 65o (1935)

Den Beweis für die Anwesenheit eines fünfgliedrigen stickstoffhaltigen Ringes lieferte er durch Methylierung und anschließenden Hofmann-Abbau des Reduktionsproduktes, wobei er Pyrrol erhielt.

Um die genaue Stellung der Methylgruppe im Pyrrolizidingerüst festlegen zu können, synthetisierte er Pyrrolidine mit verschiedenen Methylsubstitutionen und verglich deren Pikrate mit dem des Abbauproduktes von l-Heliotridan.

Durch Ausschlußverfahren konnte er daraufhin dem l-Heliotridan* folgende Struktur zuordnen:



ADAMS bearbeitete die Pyrrolizidinalkaloide besonders intensiv. Er behandelte ausführlich deren Chemie und führte weitreichende Synthesen zur Strukturaufklärung durch. Dabei erkannte er, daß es sich hierbei um Esteralkaloide handelt, deren Grundkörper aus dem Pyrrolizidinring besteht, der eine oder zwei alkoholische Hydroxylgruppen tragen kann.
Diesem Ringsystem gab er den Namen " Necin " .

Die Alkaloide sind chemisch sehr ähnlich, so daß eine exakte Trennung nur unter großen Schwierigkeiten möglich ist.

---

* Die in der Formel angegebene Zählweise ist nur für Pyrrolizidinringe gültig und wird heute noch durchgeführt.

ADAMS gelang diese durch fraktionierte Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform als Fließmittel.

Aus Senecio longibus isolierte er vier Alkaloide, denen das Necin Retronecin zugrundeliegt[6].

Diese Trennmethode ist jedoch nur dann anwendbar, wenn die Alkaloide stabil sind und durch verschiedene Polarität differierieren.

Aus den Ergebnissen seiner Untersuchungen schließt ADAMS nicht aus, daß einige in der Literatur beschriebene Pyrrolizidinalkaloide in Wirklichkeit nicht aufgetrennte Alkaloidgemische darstellen.

BULL, CULVENOR und DICK berichten ebenfalls über Schwierigkeiten bei der Auftrennung dieser Substanzen und stellen darüber hinaus fest, daß viele Alkaloide durch Oxidation, Lichteinwirkung, Veresterifung und Trennmaterialien zersetzt werden[7]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Trennmethode von ADAMS mit Vorsicht anzuwenden. Bei einer säulenchromatographischen Trennung muß mit Zersetzungsreaktionen gerechnet werden, die eine Isolierung von Artefakten zur Folge haben können.

Wie schon erwähnt erkannte ADAMS, daß es sich bei den Pyrrolizidinalkaloiden um Ester handelt. Diese sind aus den beschriebenen Necinen und ein- oder zweibasischen Karbonsäuren zusammengesetzt.

---

6) R. Adams und T. R. Gavindachari, J. Am. Chem. Soc., 71, 118o (1949)

7) L. B. Bull, C. C. J. Culvenor und A. T. Dick, "The Pyrrolizidine Alcaloids", North Holland Publishing Company, Amsterdam (1968)

Auch über diesen Säureanteil verdankt man ADAMS und Mitarbeitern die ersten Aufklärungen und Berichte[8].

Er nannte diese Säuren in Anlehnung an die Grundkörper "Necinsäuren".

Die Strukturaufklärung der Necinsäuren bereitete wenig Schwierigkeiten, da sie leichter zugänglich und einfacher gebaut sind als die Aminoalkohole; außerdem sind die am häufigsten vorkommenden Necinsäuren seit langem bekannt.

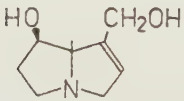
In Anlehnung an die grundlegenden Untersuchungen der vorgenannten Autoren konnte die Struktur zahlreicher Pyrrolizidinalkaloide aufgeklärt werden.

In Tabelle 1 sind die bisher bekannten Necine und in Tabelle 2 die Grundstrukturen der Necinsäuren zusammengefaßt.

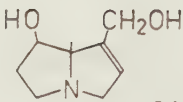
---

8) R. Adams und E. F. Rogers, J. Am. Chem. Soc., 63, 537 (1941)
R. Adams und K. E. Hamlin, ebenda, 64, 2587 (1942)
R. Adams und J. E. Mahan, ebenda, 64, 2588 (1942)
R. Adams, M. Carmack und J. E. Mahan, ebenda, 64, 2593 (1942)
R. Adams und N. J. Leonhard, ebenda, 66, 257 (1944)

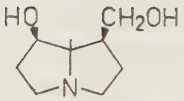
Tabelle 1: Struktur der Necine



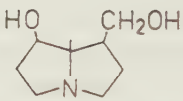
Retronecin[8]



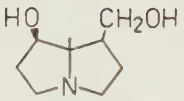
Heliotridin[8]



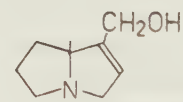
Platynecin[8]



Dioxyheliotridan[9]



Hastanecir[10]



Supinidin[11]

---

9) G. P. Menschikov und A. D. Kuzovkov, J. Gen. Chem. USSR, 19, 1702 (1949)

10) V. S. Konovalov und G. P. Menschikov, Zh. Obschch. Khim., 15, 328 (1945)
Chem. Abstr., 40, 3760 (1946)

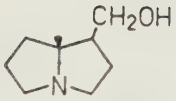
11) G. P. Menschikov und E. L. Gerevich, J. Gen. Chem. USSR, 19, 1383 (1949)

12) G. P. Menschikov, J. Gen. Chem. USSR, 16, 1311 (1946)

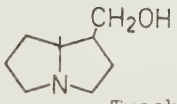
13) F. Galinovsky, H. Goldberger und M. Pohm, Monatsh. Chem., 80, 550 (1949)

14) M. F. Richardson und F. L. Warren, J. Chem. Soc. 1943, 452

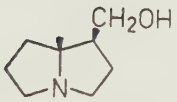
15) C. K. Atal, K. K. Kapur, C. C. J. Culvenor und L. W. Smith, Tetrahedron Lett., 1966 a, 537



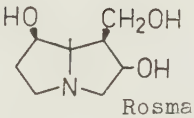
Isoretronecanol[8/12)]



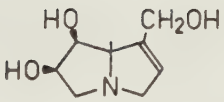
Trachelantharidin[12)]



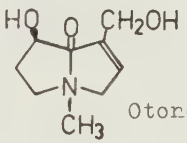
Laburnin[13)]



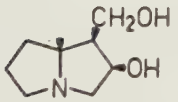
Rosmarinecin[14)]



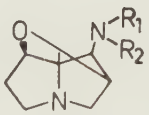
Crotanecin[15)]



Otonecin[16)]



Macronecin[17)]



$R_1=R_2=H$: Norlolin[18)]

$R_1=H$, $R_2=CH_3$: Lolin[18)]

$R_1=CH_3$, $R_2=C(=O)-CH_3$: Lolinin[18)]

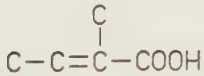
---

16) E. S. Zhdanovich und G. P. Menschikov, J. Gen. Chem. USSR, 11, 835 (1941)
A. V. Danilova und R. A. Konovalova, ebenda, 2o, 1921 (195o)

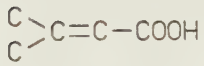
17) A. V. Danilova und L. M. Utkin, Zh. Obschch. Khim., 3o, 345 (196o)
V. S. Alekseev und A. J. Ban'kovkii, Farm. Zh. (Kiev) 2o, 49 (1965)

18) S. Y. Yunusov und S. T. Akramov, Zh. Obschch. Khim., 25, 1813 (1955); 3o, 677 (196o); 3o, 683 (196o); 3o, 3132 (196o)

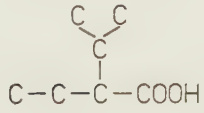
Tabelle 2: Grundstruktur der Necinsäuren



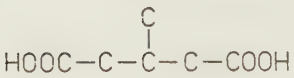
Angelika- / Tiglin-



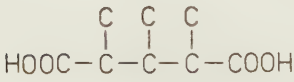
Senecioin-



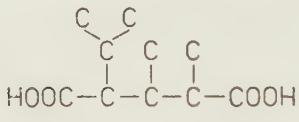
Echimidin- / Heliotrin-
Lasiocarpin- / Macrotomin-
Trachelanthin- / Viridiflorin-



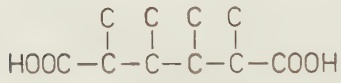
Dicrotalin-



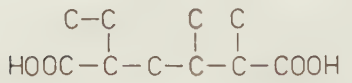
Fulvin- / Crispatin-
Monocrotalin-



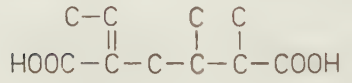
Grantianin- / Incanin-
Juncein- / Trichdesmin-



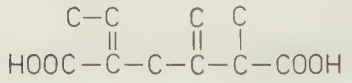
Sceleranecin- / Sceleratinin-



Jacobin- / Jacolin- / Jacozin-



Integerrinecin- / Isatinecin-
Retronecin- / Senecin- /
Usaramoensin



Riddellin- / Seneciphyllin-
Spartioidinecin-

- s ä u r e

1.3. Pharmakologische Aspekte

Über die pharmakologische Wirkung der Senecioalkaloide liegen weitreichende Untersuchungen vor.

Wie bereits eingangs erwähnt, spielten Kreuzkrautarten schon im Mittelalter in der Humanmedizin eine bedeutende Rolle. Einige dieser Arten werden auch heute noch in mehreren Arzneimittelzubereitungen verabreicht; es sind dies Senecio Fuchsii und Senecio nemorensis. Sie werden bei Blutungen verschiedenster Genese eingesetzt und sollen eine antidiabetische Wirkung besitzen.

Die Anwendung dieser Drogen ist umstritten.
MANSTEIN hat 1953 einen Extrakt aus Senecio Fuchsii als gut wirksam bei Uterusblutungen angepriesen und konnte hierbei keine Nebenwirkungen feststellen[2)].

Da' . ist von Bedeutung, daß seine Senecioanwe. tungen nie länger als drei Wochen dauerten.

Nach den heutigen Erkenntnissen ist die Verabreichung von Senecio Fuchsii-Extrakten bedenklich, da andere Senecioarten bereits seit langem als toxisch bekannt sind.

GILRUTH konnte bereits 1903 in Neu-Seeland feststellen, daß Verfütterung von Senecio jacobaeae an Kälber deren Tod nach 27, bzw. 29 Tagen zur Folge hatte[19)].

Er führte dann noch Versuche mit anderen Tierrassen durch und kam zu ähnlichen Ergebnissen.

Nach Autopsie stellte er eine sehr starke Vergrößerung der Leber und mikroskopisch eine Deformation der Zellen dieses Organs fest.

Ähnliche Testreihen wurden 1906 in Kanada von PETHICK durchgeführt. Er kam zu ähnlichen Resultaten wie GILRUTH.

---

19) J. A. Gilruth, 11th Ann. Rept. Dept. Agr., N. Z., Div. Vet. Sci., 1903, 228/ Bull. N. Z. Div. Vet. Sci., 1905, No. 9

Nach diesen ersten Hinweisen auf die Toxizität von Senecioarten wurden 1911 von CUSHNY Untersuchungen mit isolierten Alkaloiden durchgeführt[20]. Er injizierte Katzen, Ratten und Mäusen das Alkaloid Senecifolin, das aus Senecio latifolius gewonnen wurde. Hierbei stellte er Lebernekrosen fest. Diese Resultate standen mit denen in Übereinstimmung, die GILRUTH und PETHICK bei der Ganzdrogenverfütterung von Senecio jacobaeae erzielt hatten.

Durch die Arbeiten von CUSHNY war der Nachweis erbracht, daß der Wirkungsträger in den Alkaloiden zu sehen war.

Erstaunlicherweise wurden danach etwa 4o Jahre lang keine neuen Erkenntnisse mehr über die pharmakologische Wirksamkeit von Senecioarten bekannt.

1954 zeigten SCHOENTAL und PEACOCK, daß nach einjähriger Verfütterung der Gesamtalkaloide von australischer Senecio jacobaeae im Trinkwasser bei Ratten Lebertumore und Metastasen auftraten[21].

SEDLMEIER, DAHME und SCHIEFER stellten 1959 ebenfalls Lebertumore an Ratten fest, die mit deutscher Senecio vulgaris gefüttert worden waren[22].

In zahlreichen Versuchen, die von BULL und Mitarbeitern [23/24] und von SCHOENTAL und Mitarbeitern[21/25] durchgeführt wurden, zeigte sich, daß nicht alle Senecioarten gleich stark toxisch wirken.

---

20) A. R. Cushny, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2, 531 (1911)

21) R. Schoental, M. A. Head und P. R. Peacock, Br. J. Cancer, 8, 458 (1954)

22) Sedlmeier, Dahme und Schiefer, Zentralbl. Veterinaermed., VI, 854 (1959)

23) L. B. Bull, A. T. Dick und J. S. McKenzie, J. Pathol. Bacteriol., 75, 17 (1958)

24) L. B. Bull und A. T. Dick, J. Pathol. Bacteriol., 78, 483 (1959)

Da zwischenzeitlich die Struktur der meisten Pyrrolizidinalkaloide aufgeklärt worden war, konnten Rückschlüsse zwischen chemischem Aufbau und toxischer Wirkung gezogen werden. Dabei erkannte SCHOENTAL, daß sowohl die Struktur des Necins als auch die der Necinsäure die Toxizität der Alkaloide beeinflußt[25].

Für die leberschädigende und kanzerogene Wirkung können mehrere Faktoren verantwortlich gemacht werden:

> Stark hepatokanzerogen wirken Alkaloide, deren Aminoalkohol mit einer in Tabelle 2 (S. 14) aufgeführten Necinsäure verestert ist, vor allem dann, wenn die Veresterung an der primären alkoholischen Hydroxylgruppe stattgefunden hat.
> Ein weiteres Merkmal für toxische Wirkung ist das Auftreten einer Doppelbindung in Position 1,2 im Pyrrolizidinringsystem. Bei gesättigten Aminoalkoholen werden diese Nebenwirkungen nur in wenigen Fällen beobachtet.

Mit Hilfe dieser Faktoren lassen sich für Alkaloide mit noch nicht bekannten pharmakologischen Eigenschaften gewisse Voraussagen über ihre Toxizität machen.

Sind in einem Alkaloid alle diese chemischen Merkmale vertreten, ist mit Hepatokanzerogenität zu rechnen. Fehlt dagegen eins oder mehrere dieser Charakteristika, kann jedoch hieraus noch nicht auf seine Unschädlichkeit geschlossen werden. Es bedarf vielmehr eingehender pharmakologischer Untersuchungen, um über die Toxizität eine Aussage machen zu können. Arzneimittel, die solche Wirkstoffe enthalten, sollten deshalb in der Humanmedizin nur mit Vorbehalt angewendet, wenn nicht sogar abgelehnt werden, da die Möglichkeit einer leberschädigenden Nebenwirkung besonders bei Dauermedikamentation nicht ausgeschlossen werden kann.

---

25) R. Schoental, Cancer Res., 28, 2237 (1968)

1.4. Problemstellung

Senecio Fuchsii kommt eine gewisse Bedeutung zu, da sie als Droge heute noch in der Humanmedizin Verwendung findet. Sie befindet sich als Diabetikertee und in Extraktform zur Behandlung von Blutungen verschiedenster Genese im Handel. Senecio Fuchsii wird ausführlich im HEGI beschrieben[26]. Neben Senecio Jaquinianus wird sie dort als Unterart von Senecio nemorensis aufgeführt.

Die Trennung zwischen Fuchsii und Jaquinianus gestaltet sich oft schwierig. Im Gebirge zieht Fuchsii die tiefen und sonnigen, Jaquinianus die hohen und schattigen Lagen vor. In Zwischenzonen gehen diese beiden Arten ineinander über. Ob es sich hierbei um Hybridisierung, Bastardisierung oder einfach um Extremformen der Variationsbreiten handelt, ist noch nicht festgestellt worden.

Senecio Fuchsii (Gmel.) Dur. (= S.sarracenicus L.p.p., = S. salicifolius Gmel., = S. alpestris Gaud., = S. Nemorensis L.var. Fuchsii Koch) wird als schlanke, braunrot überlaufene Pflanze charakterisiert. Sie neigt zur Ausläuferbildung. Die mittleren und oberen Laubblätter sind am Grunde deutlich stielartig zusammengezogen. Sie sitzen jedoch nicht ganz stengelumfassend. Die oberen Laubblätter sind lanzettlich, wogegen die unteren auch eiförmig sein können. Sie sind etwa fünfmal so lang wie breit, scharf und fein gesägt und in den Zahnbuchten wimpernlos. Normalerweise sind sie beiderseits kahl.

Der Kopfstand ist locker mit dünnen Blütenstielen. Dessen Hüllblätter sind 9 - 11 mm lang und besitzen zylindrisches Aussehen. Die Köpfe bestehen aus fünf Strahl- und sechs bis fünfzehn Scheibenblüten.

---

26) G. Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, VI. Band, 2. Hälfte, 76o

Die Früchte sind vier mm lang, längs gestreift und kahl. Der Pappus wird zur Blütezeit nur so lang wie die Scheibenblüte und zur Fruchtzeit etwa dreimal so lang wie die Frucht. Die Blütezeit reicht vom Juli bis zum September.

Die Pflanze kommt in feuchten Wäldern und Gebüschen, auf Kahlschlagflächen, Waldrändern und Auwiesen vor. Sie wächst vom Hügelland bis in die Voralpen; sie bevorzugt also die montane Stufe.

Das allgemeine Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Mitteleuropa bis in den nördlichen Balkan.

Über die Inhaltsstoffe von Senecio Fuchsii werden im HEGI keine Angaben gemacht. Auch in ähnlichen Nachschlagwerken fehlen hierüber Aussagen.

Erste Berichte über ein Alkaloid werden von MANSKE gemacht[27]) Er bezieht sich auf MÜLLER, der 1920 Fuchskreuzkraut erwähnt und auf Inhaltsstoffe untersucht hat[1]).

MÜLLER fand eine Alkaloidsubstanz, der er den Namen "Fuchsisenecionin" gab. Aufgrund einer Elementaranalyse ordnete er ihr die Summenformel $C_{12}H_{21}NO_3$ zu.

MANSTEIN beschreibt 1953 diesen Inhaltsstoff als "Senecionin", das aus "Senecinecin" und Senecinsäure" bestehen soll[2]). Das von ihm erwähnte "Senecinecin" soll mit dem bereits bekannten Retronecin und die "Senecinsäure" mit der 2-Oxi-3-methylheptendicarbonsäure identisch sein.

CORCILIUS isolierte 1955 ein Alkaloid, dessen Säureanteil er durch Elementaranalyse als Angelikasäure festlegte[28]). Er subtrahierte von der Formel, die von MÜLLER angegeben wurde, die Summenformel der Angelikasäure und erhielt so ein Necin mit der Summenformel $C_7H_{13}NO$. Da aus Senecioarten nur Alkaloide der Pyrrolizidinreihe isoliert wurden, postulierte er für dieses Necin die Struktur eines 1-Hydroxipyrrolizidins.

---

27) Manske, "The Alcaloid", Band XII (1970)
28) F. Corcilius, Planta Med., 3, 147 (1955)

LEMP führte 1973 eine erneute Drogenextraktion durch und fällte aus dem Rohextrakt eine Substanz aus, der er nach einer Elementaranalyse die Summenformel $C_{13}H_{21}NO_3$ zuordnete[29]. Durch Bromierung der Substanz konnte er auf gesättigtes Pyrrolizidinsystem schließen.

Diese - teils widersprüchlichen - Aussagen über die Inhaltsstoffe von Senecio Fuchsii waren Anlaß zu einer neuerlichen Bearbeitung der Droge.

Es ist die Frage zu klären, ob die Pflanze ein Gemisch oder nur ein einziges Alkaloid ausbildet. Wenn ein Gemisch vorliegt, muß eine Methode zur Abtrennung der Einzelsubstanzen ausgearbeitet werden.

Weiterhin ist die Reinigung der Einzelkomponenten von Bedeutung, da eine eindeutige Strukturaufklärung nur mit einer hochgereinigten Substanz möglich ist.

Schließlich soll durch die Synthese ein weiterer Beweis für die aufgestellte Struktur geliefert und gleichzeitig die Möglichkeit geboten werden, den Pflanzeninhaltsstoff in präparativen Mengen herzustellen.

---

29) G. Lemp, Planta Med., 21, 386 (1973)

2. Extraktion und Isolierung

Senecio Fuchsii wird in der Nähe von Winterberg, Hochsauerland, angebaut. Sie kann als getrocknete Droge über den pharmazeutischen Großhandel* bezogen werden.

2.1. Klassifizierung der Inhaltsstoffe auf dünnschichtchromatographischem Weg

Um festzustellen, ob die Droge Alkaloide enthält, die zur Klasse der Pyrrolizidine gehören, wird nach erschöpfender Extraktion der Pflanzeninhaltsstoffe eine DC-Analyse durchgeführt. Nach mehreren Vorversuchen hat sich eine Extraktionslösung als günstig erwiesen, die von der STADA** zur Herstellung von Pflanzentotalextrakten benutzt wird[30].

Die getrocknete und pulverisierte Droge wird 62 Stunden lang mit der STADA-Mischung auf einer Schüttelbank erschöpfend mazeriert.

Zur schonenden Aufarbeitung wird am Rotationsverdampfer eingeengt und die resultierende wässrige Lösung mit Petroläther, Äther, Chloroform und n-Butanol in der angegebenen Reihenfolge ausgeschüttelt.

Die erhaltenen Extrakte werden sowohl durch Kochen mit Aktivkohle als auch durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid gereinigt.

Die Reinigung mit Aktivkohle führte zu einer starken Aufhellung der Lösung. Die chromatographische Behandlung ließ keine farbliche Veränderung erkennen.

Die vier organischen Extrakte werden eingeengt und dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Laufmittel dient

---

30) Stada-Vorschriftenbuch, Ausgabe 1973, Teil S

* Firma Anzag, Köln

** STADA = Standard-Arbeitsvorschriften deutscher Apotheker

zunächst ein Gemisch aus Chloroform, Aceton, Äthanol und konzentriertem Ammoniak.
Die Analysen werden auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator durchgeführt. Unter UV-Licht lassen sich mehrere Flecken erkennen, von denen drei mit Dragendorff's Reagenz anfärbbar sind.

Um die hierbei mangelhafte Trennung zu verbessern, werden verschiedene Fließmittel eingesetzt, wobei besonders konstant siedende Gemische berücksichtigt werden.

Als geeignet erweisen sich zwei Gemische, die aus Methylenchlorid/Methanol und Benzol/Butanol-2 bestehen. Die Trennschärfe ist aber wegen der vorgegebenen geringen Polarität nicht optimal.

Deshalb werden Laufmittel getestet, deren Einzelkomponenten fast gleichen Siedepunkt aufweisen, sich aber durch verschiedene Polarität auszeichnen.

Zwei Gruppen mit jeweils drei verschiedenen Lösungsmitteln sind in vorliegendem Fall verwendbar. Dies sind Trichloräthylen/Isopropylazetat/Triäthylamin und Benzol/2-Butanon/n-Butylamin.

Das letzte Laufmittel zeichnet sich durch besonders gute Trennleistung und optimale Laufhöhe aus. Mit diesem Gemisch wird erneut eine DC-Analyse durchgeführt.

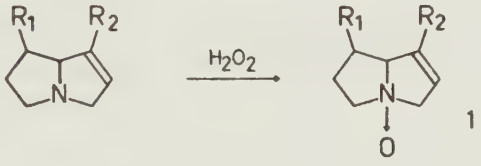
Zum speziellen Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden wird eine von DANN erstmals beschriebene Methode angewendet, die für die Dünnschichtchromatographie in geeigneter Weise modifiziert wird[31].

Dazu werden die entwickelten DC-Platten mit Wasserstoffperoxid, Acetanhydridreagenz und mit Ehrlich's Reagenz besprüht. Nach jedem Sprühvorgang wird 35 Minuten auf 1oo° C erhitzt und danach abkühlen lassen.

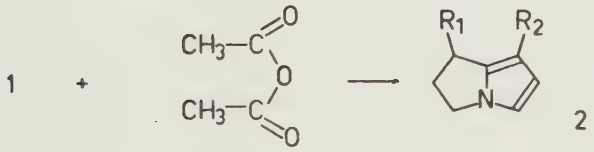
---

31) A. T. Dann, Nature (London), 186, 1o5o (196o)

Das Auftreten von blau gefärbten Flecken deutet auf Pyrrolizidinalkaloide hin. Hierbei wird folgender Reaktionsmechanismus angenommen:



1



2

2 + Ehrlich's Reagenz ⟶ Blaufärbung

Danach lassen sich nur solche Pyrrolizidine nachweisen, die eine Doppelbindung besitzen. Eine positive Reaktion tritt nach MATTOCKS aber auch dann auf, wenn sich noch eine Hydroxylgruppe in Position 7 am Pyrrolizidinring befindet[32]. Hierbei kann diese Gruppe unter Ausbildung einer Ring-Doppelbindung eliminiert werden.

Bei der durchgeführten DC-Untersuchung werden zwei braunblaue und ein blauer Fleck festgestellt.
Damit ist der Nachweis erbracht, daß Pyrrolizidinalkaloide in Senecio Fuchsii enthalten sind.
Da aus der Literatur bekannt ist, daß diese Alkaloide auch als N-Oxide vorliegen können, wird die gleiche DC-Untersuchung jetzt ohne Anwendung von Wasserstoffperoxid durchgeführt.

---

32) A. R. Mattocks, J. Chromatogr., 27, 505 (1967)

Das Ergebnis ist dem vorhergegangenen ähnlich; die Flecken unterscheiden sich lediglich in der Farbintensität. Danach liegt ein bestimmter Teil der Alkaloide als N-Oxide vor.

Im Anschluß daran wird untersucht, ob diese N-Oxide während des Extraktionsprozesses entstehen oder schon in der Droge als solche vorliegen.

Dazu wird ein unter Stickstoffbegasung hergestellter Extrakt sofort und nach Aufbewahrung an der Luft der oben beschriebenen Analyse unterworfen.

Hierbei zeigt sich, daß nach sauerstoffreier Extraktion keine N-Oxide nachzuweisen sind. Nach länger andauernder Lufteinwirkung nimmt der Gehalt an N-Oxiden dagegen stetig zu und die Oxidation ist nach einer Woche quantitativ abgeschlossen.

Danach tritt eine völlige Zersetzung der Alkaloide ein. Der Nachweis mit Dragendorff's Reagenz verläuft dann negativ. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die in Senecio Fuchsii enthaltenen Alkaloide nicht als N-Oxide vorliegen, jedoch leicht oxidierbar sind.

Die Extraktion der Droge und die Isolierung der Inhaltsstoffe muß daher unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden.

Diese Voruntersuchungen beweisen, daß Senecio Fuchsii Alkaloide enthält, die zur Gruppe der Pyrrolizidinester gehören müssen.

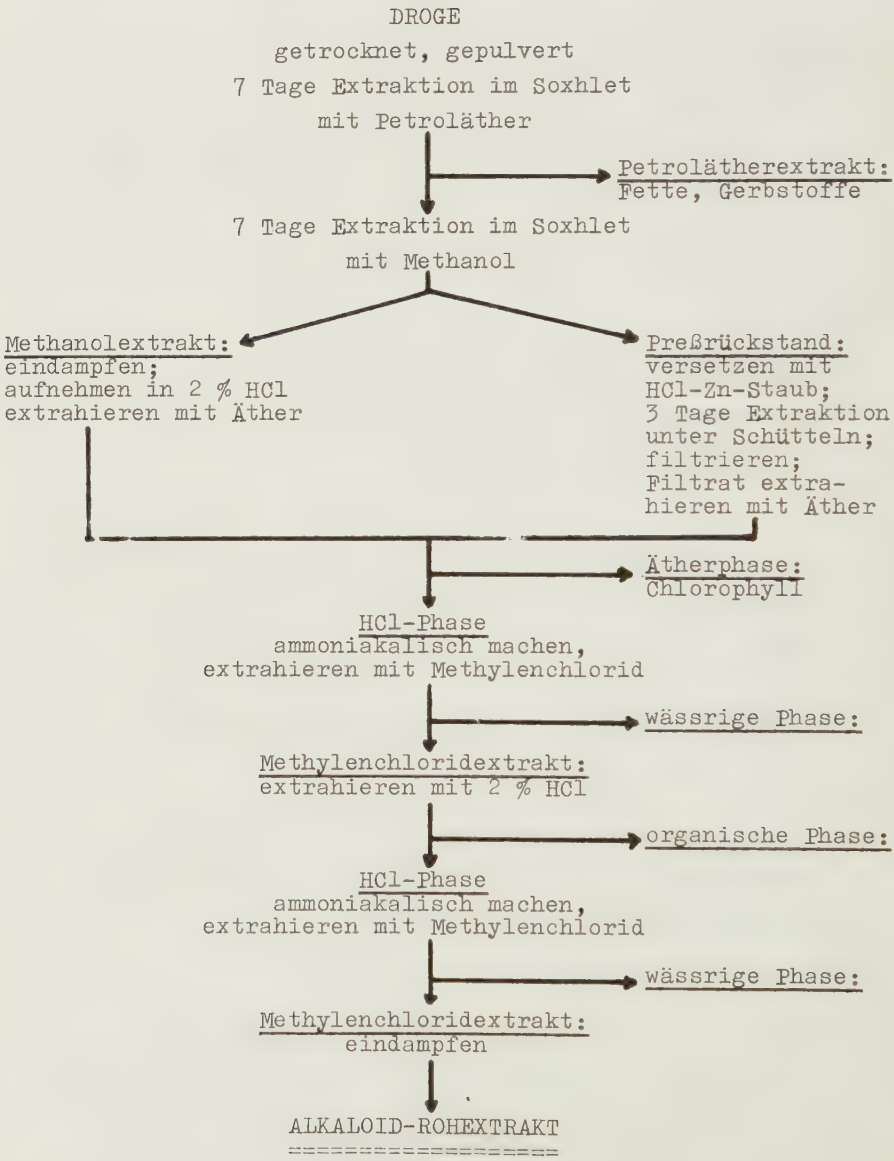
2.2. Extraktion

Zur schonenden Extraktion der Alkaloide aus der Droge wird ein Schema ausgearbeitet, das der Oxidationsempfindlichkeit und der Esternatur der vorliegenden Substanzen Rechnung trägt. Der eigentlichen Extraktion geht eine Entfettung mit Petroläther voraus, da sonst eine saubere Aufarbeitung erschwert wird.

Der gesamte Extraktionsablauf wird unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt

In Abbildung 1 ist dieses Extraktionsschema wiedergegeben.

Abb. 1: Extraktionsschema



2.3. Trennung und Isolierung

Durch das beschriebene Verfahren wird ein zäher, dunkelroter, sirupartiger Alkaloid-Rohextrakt erhalten.

Zunächst wird versucht, die vorhandenen Alkaloide direkt durch Ausfällung zu gewinnen. Dazu wird der Extrakt in einem Gemisch aus gleichen Teilen Äther und Methanol aufgenommen. Unter Eiskühlung wird trockenes HCl-Gas eingeleitet.
Auf diesem Wege wird keine Substanz erhalten, die eine Alkaloidreaktion zeigt.

Da der Versuch einer direkten Kristallisation ohne Erfolg bleibt, muß zuerst eine Trennung der Einzelkomponenten von den Begleitstoffen vorangehen.

2.3.1. Säulenchromatographie

Eine häufig angewendete Trennmethode in präparativem Maßstab ist die Säulenchromatographie.

Eine Glassäule von einem Meter Länge und drei Zentimeter Durchmesser wird nach dem üblichen Verfahren mit Kieselgel in Chloroform gefüllt.

Der Rohextrakt wird in wenig Chloroform aufgenommen und auf die Säule gebracht. Es wird mit einem Fließmittel, das aus Chloroform, Aceton, konzentriertem Ammoniak und Äthanol besteht, eluiert. Hierbei kommt es zu einem Substanzverlust von über 95 %. Trotz Erhöhen der polaren Komponente wird keine Trennung erreicht. Um das noch verbliebene Ausgangsprodukt zurückzugewinnen, wird der Säuleninhalt mit Methanol extrahiert. Bei der Anwendung eines zweiten Fließmittels, bestehend aus Benzol, 2-Butanon und n-Butylamin, tritt totale Zersetzung ein:
Diese wird entweder durch die Lösungsmittel oder das verwendete Kieselgel ausgelöst.

2.3.2. Dünnschichtchromatographie

Um die Einflüsse der Lösungsmittel auf die Alkaloide zu untersuchen, werden die Einzelkomponenten der Fließmittelgemische jeweils fünf Stunden mit Alkaloid-Rohextrakt unter Stickstoffbegasung am Rückfluß gekocht. Anschließend wird eine DC-Analyse durchgeführt.
Dabei zeigt sich, daß mit Chloroform eine Veränderung des RF-Wertes und mit n-Butylamin eine totale Zersetzung eintritt. Mit Ammoniak wird in der Hitze eine Verseifung beobachtet, die jedoch in der Kälte unterbleibt.

Eine Umsetzung von Pyrrolizidinalkaloiden mit Chloroform wurde bereits von DRY und Mitarbeitern[33] und von V. KLEMPERER und Mitarbeitern[34] beobachtet und der Mechanismus aufgeklärt. Da eine analoge Reaktion mit Methylenchlorid nicht eintritt, wird anstelle von Chloroform nunmehr Methylenchlorid eingesetzt.

Die Inhaltsstoffe von Senecio Fuchsii sind aus den oben angeführten Gründen nur mit indifferenten und absoluten Lösungsmitteln zu behandeln; dies gilt sowohl für Extraktion als auch für chromatographische Trennmethoden.

Für die Dünnschichtchromatographie wird unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte ein neues Fließmittel gefunden, das optimale Trenneigenschaften aufweist. Es setzt sich aus Methylenchlorid, Methanol und konzentriertem Ammoniak zusammen. Die Einzelkomponenten werden wie oben auf Alkaloidzersetzlichkeit überprüft. Hierbei werden keinerlei Veränderungen der Alkaloide beobachtet.

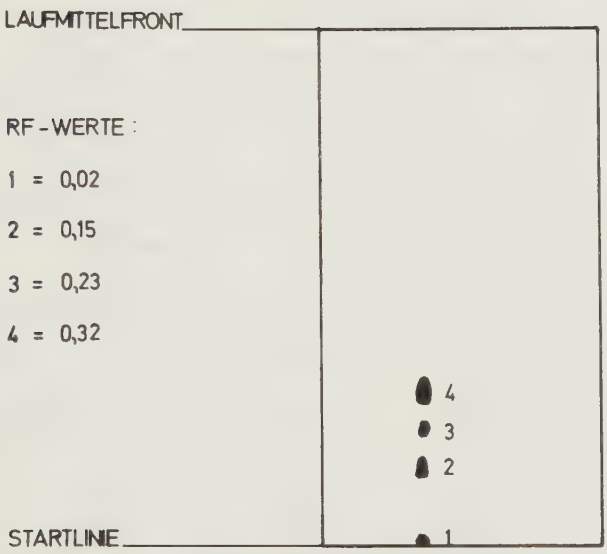
In Abbildung 2 ist das Ergebnis einer DC-Analyse in diesem Fließmittel wiedergegeben.

---

33) L. J. Dry, M. J. Koekemoer und F. L. Warren, J. Chem. Soc., 1955, 59

34) M. E. von Klemperer und F. L. Warren, Chem. Ind. (London), 1955, 1553

Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm des Alkaloid-Rohextraktes in Methylenchlorid, Methanol, konz. Ammoniak (85:14:1)



Eine Detektion der Substanzen mit Hilfe der DANN'schen Probe ergibt, daß die Flecken 2 und 4 violett-blau und die beiden anderen Flecken braun-blau angefärbt werden.

Wie in späteren Untersuchungen gezeigt werden kann, entspricht der Fleck mit dem RF-Wert o,32 einem Pyrrolizidinalkaloid und der Fleck mit dem RF-Wert o,15 seinem Aminoalkohol.

Bei den restlichen Flecken handelt es sich offenbar um Zersetzungsprodukte des Alkaloids.

2.3.3. Trockensäulenchromatographie

Die Ergebnisse der in 2.3.2. beschriebenen DC-Analyse werden nochmals auf die Säulenchromatographie übertragen. Um diese Trennmethode möglichst schonend zu gestalten, kommt die Trockensäulenmethode nach LOEV zur Anwendung[35].

Danach wird ein hochfeines Kieselgel mit der Korngröße von o,1 - o,25 mm Durchmesser trocken in Plastikschlauchfolien unter N_2-Begasung eingefüllt und mit einem Vibrator festgerüttelt. Das zu trennende Gemisch wird wie gewohnt auf das obere Säulenende aufgetragen. Als Laufmittel wird das oben genannte Fließmittelgemisch verwendet.
Es werden keine Fraktionen aufgefangen, sondern die Fließmittelzugabe wird gestoppt, sobald das untere Säulenende erreicht ist.
Die Säule wird getrocknet, die gewünschten Zonen nach UV-Detektion markiert und ausgeschnitten. Das anfallende Kieselgel wird mit Methanol/Methylenchlorid extrahiert und abfiltriert. In das Filtrat wird nach dem Einengen am Rotationsverdampfer unter Eiskühlung bei gleichzeitiger Stickstoffbegasung trockenes HCl-Gas eingeleitet.
Aus den drei anfallenden Fraktionen werden drei Substanzen erhalten, von denen jedoch nur noch eine mit Dragendorff's Reagenz positiv reagiert.

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß trotz Verwendung eines geeigneten Fließmittels noch Zersetzung auftritt wie bei der normalen Säulenchromatographie.
Aus der DC-Analyse der noch verbliebenen Alkaloidfraktion läßt sich entnehmen, daß die Substanz noch keinen großen Reinheitsgrad besitzt.

Da die Säulenchromatographie bislang schlechte Ergebnisse erbrachte, soll in Anlehnung an die DC die Dickschichtchromatographie angewendet werden.

---

35) B. Loev et al., Chem. Ind. (London), 1965, 15; 1967, 2o26

2.3.4. Dickschichtchromatographie

Auf Glasplatten der Größe 4o x 2o cm wird eine 1 mm starke Kieselgelschicht aufgebracht. Nach dem Aktivieren wird die aus der Trockensäulenchromatographie verbliebene Alkaloidfraktion aufgetragen. Als Laufmittel dient wieder das Methylenchlorid-Methanol-Ammoniak-Gemisch. Die Platten werden unter Stickstoffatmosphäre entwickelt.

Nach UV-Detektion wird die als alkaloidhaltig erwartete Zone fixiert und ausgekratzt. Das Kieselgel wird mit Methanol extrahiert und abfiltriert.

Am Rotationsverdampfer wird auf 1o ml eingeengt und mit der gleichen Menge Äther versetzt. In diese Lösung wird unter Eiskühlung und Inertbegasung HCl-Gas eingeleitet.

Es kristallisieren sich drei Milligramm einer Substanz aus, die keine Alkaloidreaktion mehr zeigt. Es muß sich hierbei um ein Zersetzungsprodukt des Alkaloids handeln.

Die Verwendung von Kieselgel in präparativem Maßstab scheint für die vorliegenden Substanzen ungeeignet zu sein.

Als letzte Möglichkeit zur Trennung mit Kieselgel als stationärer Phase wird die dampfprogrammierte präparative Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

2.3.5. Dampfprogrammierte präparative Dünnschichtchromatographie

Die dampfprogrammierte DC-Trennung ist ein Verfahren, das zur besonders schonenden Isolierung von schwer trennbaren Substanzen geeignet ist. In der Literatur sind hiermit verschiedene gute Trennergebnisse bei Barbituraten, Steroiden, Farbstoffen, Sulfonamiden, Aminosäuren und Pflanzeninhaltsstoffen beschrieben worden[36/37/38/39].

Die Durchführung wird in analoger Weise in einer Desaga-VP-Kammer nach DE ZEEUW vorgenommen[4o].

Diese Kammer besteht aus 21 Trögen, auf denen die DC-Platte waagerecht aufliegt. Der Abstand zwischen der Platte und den Trögen kann variiert werden. Durch eine Auftragvorrichtung wird die Startlinie der Platte kontinuierlich mit dem entsprechenden Fließmittel benetzt. Die Tröge können mit verschiedenen Laufmitteln gefüllt werden. Sie sind beheizbar, so daß ein optimaler Dampfdruck über der jeweiligen Region der Platte entsteht. Durch Zwischenschalten von Trögen mit Fließmitteln niederer oder höherer Polarität kann somit ein Brems- oder Zieheffekt erzielt werden.

Hierbei hat sich gezeigt, daß durch diese gezielte Bedampfung die Trennschärfe um ein Vielfaches gegenüber der herkömmlichen DC-Analyse erhöht wird. Der Einfluß des Dampfes auf der Wanderungsstrecke ist somit entscheidend für optimale Trennungen.

Am Ende der Platte befindet sich ein Warmwasserrohr, das - mit Hilfe eines Thermostaten - ebenfalls auf die ent-

---

36) R. A. De Zeeuw, J. Pharm. Pharmacol., 2o, 545 (1968)
37) R. A. De Zeeuw, "Progress in Separation and Purification", Vol. 3, 1 - 71, Interscience N. Y., (197o)
38) R. A. De Zeeuw, Anal. Chem., 4o, 2134 (1968)
39) R. A. De Zeeuw und J. Wijsbeek, Anal. Chem., 42, 9o (197o)
4o) R. A. De Zeeuw, J. Chromatogr., 32, 43 (1968)

sprechende Temperatur gebracht werden kann. Die Temperatur wird so gewählt, daß das Fließmittel am Ende der Platte kontinuierlich abgedampft wird. Dadurch ist gewährleistet, daß die Dampfsättigung immer einen konstanten Wert behält. Dies ist für präparatives Arbeiten unumgänglich, da hier längere Trennzeiten und öfteres Wiederholen des Vorganges erforderlich sind. Als DC-Platten kommen Kieselgel-Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt, mit einer Schichtdicke von o,25 mm zur Verwendung. Aufgetragen werden 15 mg Alkaloid-Rohextrakt. Das Laufmittel entspricht dem der DC-Analyse.

Die Tröge werden mit Methylenchlorid/Methanol-Gemischen gefüllt, wobei die Polarität des jeweiligen Gemisches mit zunehmender Laufhöhe kontinuierlich abnimmt.

Die Entwicklungszeit beträgt bei einer Trogtemperatur von 18^{o} C und einer Kammersättigung von 2o Minuten zwei Stunden. Die markierten Kieselgelschichten werden abgelöst und nach dem gleichen Verfahren wie bei der Dickschichtchromatographie aufgearbeitet.

Es ergeben sich ähnlich negative Resultate wie bei den vorherigen Trennverfahren.

Diese Ergebnisse zeigen, daß keine herkömmliche präparative Methode zur Auftrennung des Alkaloidextraktes angewendet werden kann, deren stationäre Phase auf der Verwendung von Kieselgel, Aluminiumoxid oder Substanzen ähnlicher Aktivität beruht.

Es wird daher als eine der letzten noch verbleibenden Möglichkeiten zur Isolierung der Alkaloide die Gaschromatographie eingesetzt.

2.3.6. Gaschromatographie

Die gaschromatographische Trennung des Alkaloidgemisches wird zuerst in analytischem Maßstab durchgeführt, um die Bedingungen für das präparative Arbeiten festlegen zu können.

Hierfür steht ein Gaschromatograph, Typ 2800 der Firma Varian, zur Verfügung.

Als Trägergas wird nachgereinigter Stickstoff verwendet, als Brenngas dient ein Preßluft-Wasserstoff-Gemisch.

Die Substanzerkennung erfolgt über einen Flammenionisationsdetektor.

Wegen der Labilität der vorliegenden Substanzen werden Trennversuche mit verschiedenartigen Säulenfüllungen durchgeführt. Eine gute Trennung kann mit einer Säule erzielt werden, die mit 3 % SE 30 auf Varaport 30 gepackt ist.

Die stationäre Phase Varaport 30 ist eine Diatomeenerde, deren Oberflächenadsorbtion durch Behandeln mit Dimethylchlorsilan gering gehalten wird. Katalytische Effekte werden weitgehend verhindert. Um die Effizienz zu verbessern, wird bei vorliegendem Material der Abrieb entfernt.

Die flüssige Phase SE 30 ist ein Methylsilikongummivorprodukt, das sich ebenfalls durch äußerst geringe Aktivität auszeichnet und deshalb für empfindliche Substanzen gut geeignet ist.
Der vorhandene Gaschromatograph verfügt über einen multilinearen Programmgeber, womit Aufheizgeschwindigkeit und Aufheizdauer beliebig variiert werden können.

Die Aufheizphase wird in sieben Intervalle von jeweils neun Minuten unterteilt.

Die Analyse wird begonnen bei einer Einspritztemperatur von 215° C und einer Säulentemperatur von 40° C.

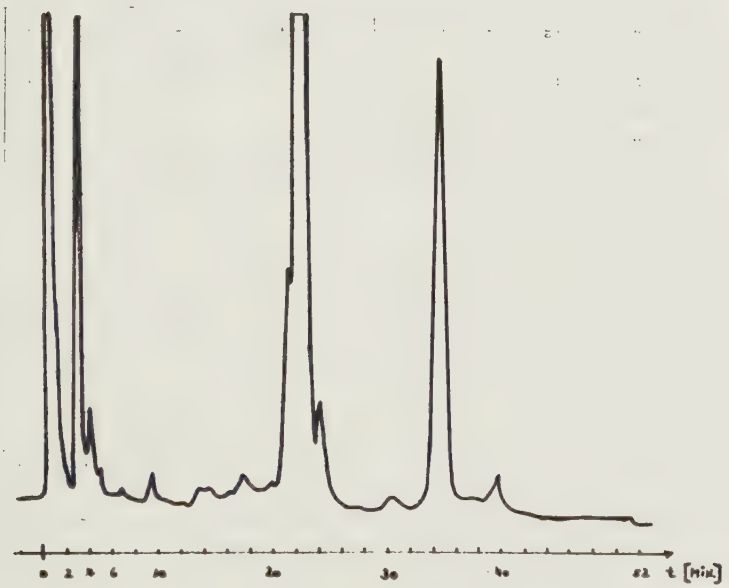
Die Endtemperatur der Säule liegt bei 230° C. Oberhalb dieser Temperatur werden keine Peaks mehr festgestellt.

Da die Substanzen langsam über die Säule wandern, wird der Trägergasstrom so gewählt, daß eine möglichst scharfe Trennung erfolgt.

Bei der hier vorgenommenen Alkaloidtrennung werden die besten Ergebnisse bei einem Trägergasfluß von 82 ml pro Minute erzielt. Pro Analyse werden von einer Lösung des Rohextraktes in Methylenchlorid fünf µl eingesetzt.

Das Ergebnis einer Trennung unter den angegebenen Bedingungen ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Abb. 3: GC des Alkaloid-Rohextraktes



Das Bild der GC-Analyse deutet darauf hin, daß mindestens drei Substanzen im Rohextrakt vorliegen.

Wie außerdem ersichtlich, liegen noch Begleitstoffe vor, die ein präparatives Arbeiten erschweren. Durch diese Begleitstoffe können vorzeitiges Erschöpfen der Säule oder Dosierungenauigkeiten hervorgerufen werden.

Es ist daher notwendig, den Extrakt vorzureinigen und gleichzeitig die Substanzen anzureichern.

Nach den negativen Ergebnissen einer Trennung über Kieselgel und Aluminiumoxid als stationäre Phase scheiden diese Substanzen zur Extraktvorreinigung aus.

Nach Versuchen mit Magnesiumsilikat hochpolymerer Struktur zeigt sich, daß mit diesem Material keine Zersetzung erfolgt, zumal wenn unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluß gearbeitet wird.*
Hierzu werden drei ca. 3o cm lange Säulen von einem Zentimeter lichter Weise trocken mit jeweils 1o Gramm Florisil gefüllt. Jede Säule ist mit einem Auffanggefäß versehen. In diese Gefäße können durch Seitenstutzen wahlweise zusätzliche Lösungsmittel gegeben werden.
Die Säulen werden so zusammengefügt, daß eine fraktionierte chromatographische Reinigung bei gleichzeitiger Inertbegasung möglich wird.

Der Extrakt wird in Methylenchlorid gelöst, auf die obere Säule gebracht und mit einem Gemisch aus Methanol/Methylenchlorid eluiert. Das Eluat wird im ersten Sammelgefäß vereinigt und mit dem gleichen Volumen Methanol verdünnt.

Diese Lösung wird auf die zweite Säule gegeben. Das hiernach resultierende Eluat wird im nächsten Gefäß aufgefangen und sofort auf die dritte Säule gebracht. Anschließend wird das gesamte System mit ca. 2o ml Methanol nachgewaschen.

Das Eluat der dritten Säule wird in drei Fraktionen aufgefangen.

Nach Einengen der einzelnen Fraktionen werden jeweils fünf µl dieser Lösungen wie beschrieben einer GC-Analyse unterworfen. In den Abbildungen 4 - 6 sind die Resultate wiedergegeben.

---

* Ein solches Magnesiumsilikat ist unter dem Namen Florisil^{R} von der Firma Merck, Darmstadt, im Handel.

Abb. 4: GC der ersten Fraktion

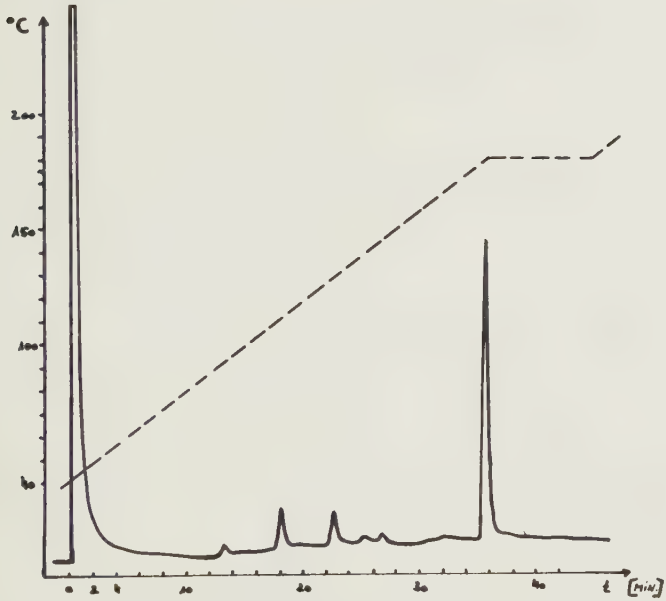


Abb. 5: GC der zweiten Fraktion

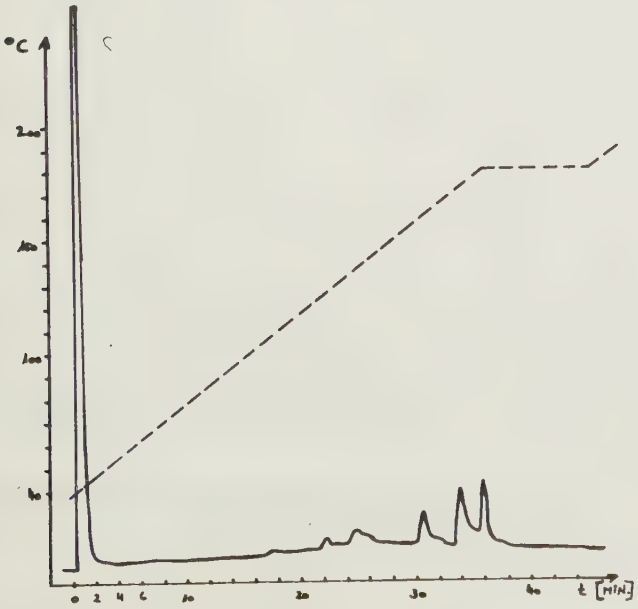
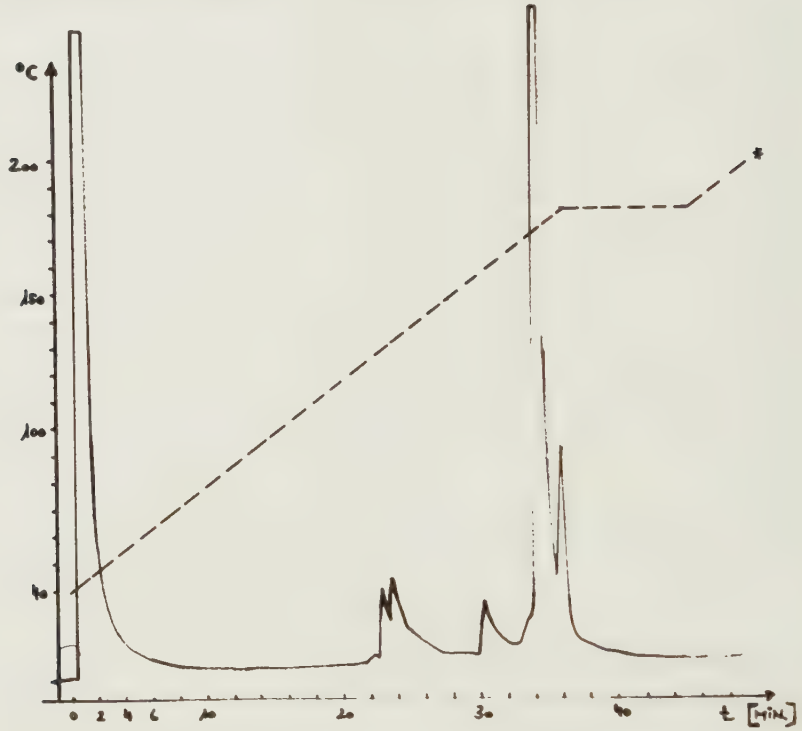


Abb. 6: GC der dritten Fraktion



Wie aus den Chromatogrammen ersichtlich ist, wird sowohl eine hohe Reinheit als auch eine Anreicherung der einzelnen Komponenten erzielt. Die Anreicherung tritt in Fraktion 1 und 3 auf, während die Begleitstoffe in Fraktion 2 verbleiben. Der Hauptpeak mit dem Rt-Wert von 35,2 Minuten kann einem gesuchten Pyrrolizidinalkaloid zugeordnet werden. Dies wird durch eine DC-Analyse der Fraktion 1 bestätigt;hierbei tritt auf der DC-Platte nur noch ein Fleck mit dem RF-Wert o,32 auf. Dieser Fleck zeigt einen positiven Nachweis mit Dragendorff's Reagenz und läßt sich mit der DANN'schen Probe blau anfärben.

---

* Die gestrichelte Linie gibt den Temperaturverlauf innerhalb der Säule während der GC-Analyse wieder.

Nachdem in Vorversuchen die gaschromatographischen Bedingungen festgelegt wurden, kann die präparative Trennung durchgeführt werden.

In Analogie zur analytischen Trennung wird eine präparative Trennsäule, gepackt mit 3 % SE 3o auf Varaport 3o eingesetzt. Wegen des größeren Säulendurchmessers müssen Einspritztemperatur und Trägergasfluß hergesetzt werden.

Im Gegensatz zum analytischen Arbeiten würde bei zu hoher Einspritztemperatur und zu starkem Trägergasfluß der Gesamtgasdruck innerhalb der Säule zu hoch, so daß eine exakte Trennung nicht mehr gewährleistet ist.

Es wird deshalb bei gleichbleibender Temperaturprogrammierung bei einer Einspritztemperatur von 17o° C und einem Trägergasfluß von 41 ml pro Minute gearbeitet.

Die einzelnen Fraktionen werden mit einer geeigneten Auffangvorrichtung gesammelt. Um Aerosolbildung zu vermeiden, muß die dampfförmig austretende Substanz sofort in Lösung gebracht werden. Hierzu werden die Einzelfraktionen in Methylenchlorid bei Zimmertemperatur aufgefangen.

Wie schon beschrieben wird der Alkaloid-Rohextrakt über Florisil vorbereitet. Die erste und dritte Fraktion werden vereinigt und einer gaschromatographischen präparativen Trennung unterworfen.

Zwei Gramm Alkaloid-Rohextrakt werden nach Vorreinigung in 2o ml Methylenchlorid gelöst. Von dieser Lösung werden pro Trennvorgang o,2 ml eingesetzt.

Durch eine Programmierung des Gaschromatographen wird dieser Prozeß automatisch wiederholt, so daß eine kontinuierliche Trennung des Extraktes unter denselben Bedingungen gewährleistet ist.

Die gesamte Trennung des Rohextraktes dauert ca. 3,5 Tage. Es werden zwei Fraktionen erhalten.

Diese werden auf ein Volumen von fünf ml eingeengt und nach Zugabe von weiteren fünf ml Methanol in je drei Portionen unterteilt.

Nach den üblichen in der Alkaloidchemie gebräuchlichen Methoden sollen die Einzelkomponenten zur Kristallisation gebracht werden.

Dazu werden die dreigeteilten Fraktionen mit 1o %-iger Zitronensäurelösung, mit 1o %-iger Goldchloridlösung und mit trockenem HCl-Gas versetzt.

Alle Kristallisationsansätze werden im Kühlschrank auf eine Temperatur von -18° C gebracht und hierbei sechs Tage lang belassen.

Nach dieser Zeit zeigen sich nur in der mit Goldchloridlösung versetzten Probe der zweiten GC-Fraktion gelbliche Kristalle. Diese Fraktion entspricht dem Hauptpeak im Gaschromatogramm und enthält das gesuchte Alkaloid.

Die Probe wird mit weiterer Goldchloridlösung versetzt und noch vier Tage lang unter Tiefkühlung belassen.

Der oben beschriebene präparative Trennprozeß wird mehrfach wiederholt. Es werden insgesamt 15o mg des Goldchloridsalzes des Alkaloids erhalten.

Das so gewonnene Salz wird einmal aus einem Methanol-Methylenchlorid-Gemisch umkristallisiert.

Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 156° C.

Das Salz ist in Wasser, Methanol, Äthanol und Isopropanol leicht löslich. Löslich ist es in n-Butanol und Aceton. In höheren Alkoholen, Methylenchlorid, Benzol, Äther und Petroläther ist es unlöslich.

3. Strukturaufklärung

Durch die Arbeiten von ADAMS und Nachfolgern ist bekannt, daß alle bisher bekannten Pyrrolizidinalkaloide als Ester vorliegen. Durch Vorversuche wird auch beim vorliegenden Alkaloid die Esterstruktur bewiesen.

Es wird anschließend ein geringer Teil des Goldsalzes verseift, um die Strukturaufklärung zu erleichtern. Hierzu wird mit Kalilauge unter N_2-Begasung am Rückfluß gekocht.

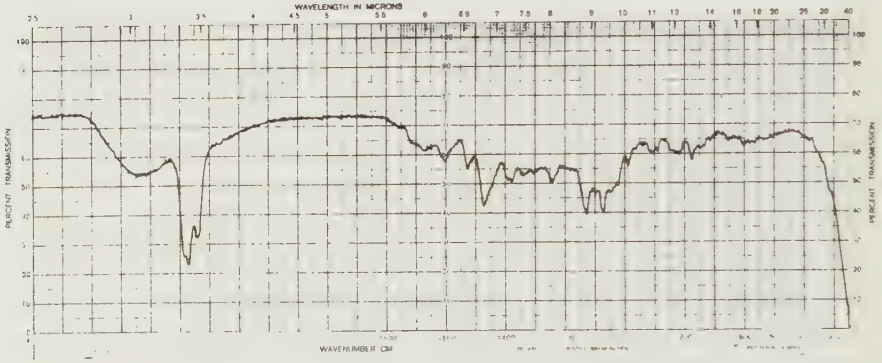
Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird mit Methylenchlorid extrahiert. Der in dieser Phase enthaltene Aminoalkohol kristallisiert nicht direkt aus. Er wird analog zum Alkaloid als Goldchloridsalz abgetrennt.

Nach Ansäuern der wässrigen Phase des Reaktionsgemisches wird nunmehr mit Äther extrahiert. Die Necinsäure kristallisiert aus der ätherischen Phase beim Einengen in langen Nadeln aus. Zur Reinigung wird diese Substanz einer Mikrodestillation unterzogen. Der Siedepunkt beträgt bei 760 Torr 205 - 208° C.

3.1. Necin

Das IR-Spektrum des Aminoalkohols ist in Abbildung 7 wiedergegeben.

Abb. 7: IR-Spektrum des Aminoalkohols



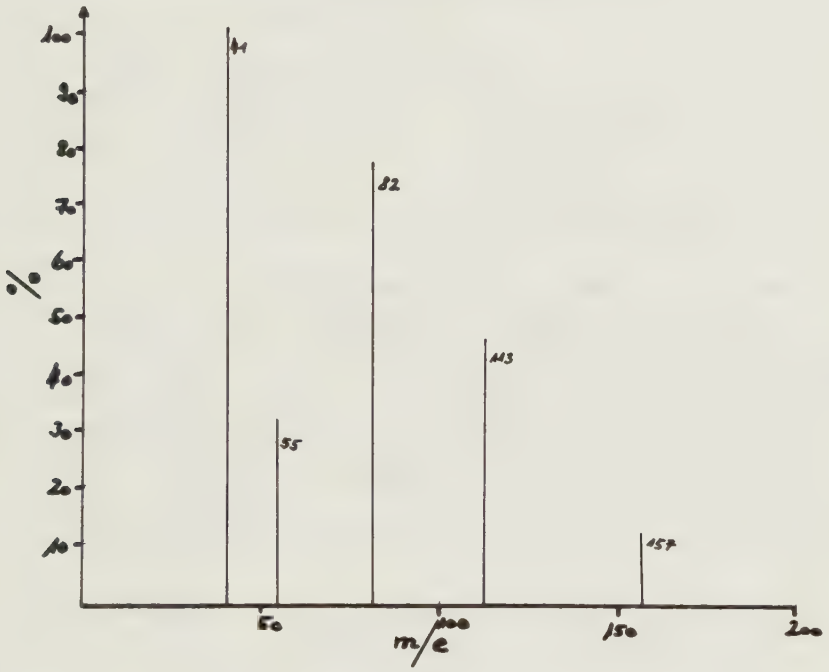
Charakteristische Banden treten auf bei 1o7o cm^{-1} und 1125 cm^{-1}. Es sind dies die C-O-Streckschwingungen für einen primären und einen sekundären Alkohol. Die dazugehörigen O-H-Streckschwingungen sind als Bauch bei 33oo cm^{-1} zu sehen.

Bei 295o cm^{-1} tritt eine Adsorption auf, die für ein tertiäres Amin spricht.

Es kann hiernach ein Pyrrolizidinkörper vorliegen, der eine primäre und eine sekundäre alkoholische OH-Gruppe besitzt und keine Doppelbindung aufweist.

Weitere Strukturmerkmale können dem Massenspektrum entnommen werden, das in Abbildung 8 wiedergegeben ist.

Abb. 8: Massenspektrum des Aminoalkohols

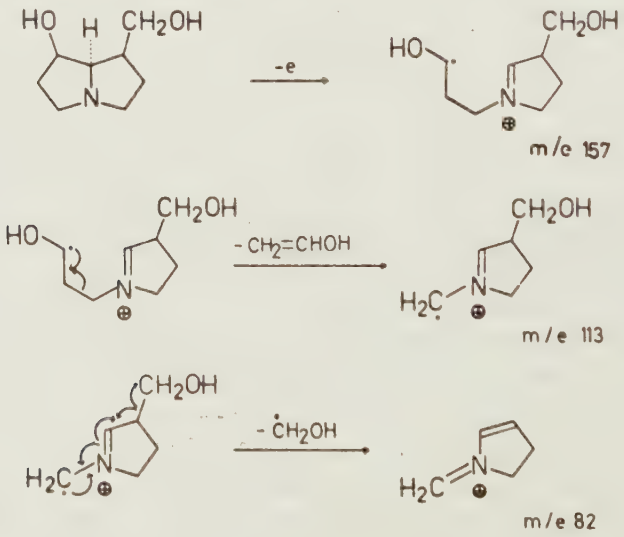


Die Aufnahme der Massenspektren von Naturstoffsalzen sind oft problematisch, da diese Salze meistens Zersetzungs- anstatt definierte Schmelzpunkte aufweisen. Das bedeutet, daß diese Substanzen sich bereits beim Erwärmen der Probe zersetzen und keinen Molekülpeak mehr ergeben.
Auch die Zuordnung der Fragmente ist mit Schwierigkeiten verbunden, da die Bruchstücke sowohl durch Massenzerfall als auch durch einfache Zersetzung entstehen können.

Im vorliegenden Fall geht der Aminoalkohol mit dem Goldchlorid keine feste Bindung ein, sondern er bildet offenbar eine Art Chelatkomplex. Diese Bindung ist so schwach, daß die Substanz als freie Base vermessen wird und so auch im Massenspektrum erscheint.

Man erkennt eine Fragmentierung mit den Massenzahlen: m/e 157, 113, 82, 55 und 41.
Der Peak m/e 82 beweist, daß es sich hier um ein Pyrrolizidingerüst handelt. Er tritt bei den Verbindungen dieser Klasse auf, die ein gesättigtes System aufweisen. Pyrrolizidine, die eine Doppelbindung besitzen, zeigen diesen Peak bei m/e 8o[41].

Nach dem Molekülpeak von 157 kommen nach Tabelle 1 (S. 12) nur Platynecin, Dioxyheliotridan, Hastanecin und Macronecin in Betracht.
Ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal der genannten Aminoalkohole ist eine OH-Abspaltung vom Molekülpeak. Sie tritt auf, wenn die Oximethylgruppe cis-ständig zum C_8-Wasserstoff steht. Da ein Peak bei m/e 14o (157 - 17) nicht erscheint, muß es sich bei dem vorliegenden Necin um Platynecin handeln, da dieser eine trans-Stellung der Oximethylgruppe zum C_8-Wasserstoff aufweist.
Danach kann folgendes Fragmentierungsmuster angenommen werden:



41) N. Neuner-Jehle et al., Monatsh. Chem., 96, 321 (1965)

Ein ähnlicher Zerfall, der noch denkbar wäre, kommt nicht in Betracht, da der hierbei auftretende Peak von m/e 99 nicht im Spektrum vorhanden ist:

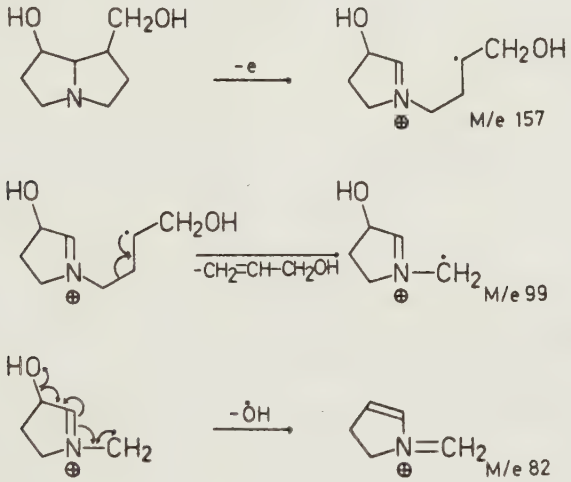


Abbildung 9 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum des Aminoalkohols und Abbildung 1o dasselbe Spektrum nach Austausch mit D_2O.
Die Interpretation der NMR-Spektren der Pyrrolizidine ist mit Schwierigkeiten verbunden, da durch vielfältige Kopplung der einzelnen Protonen untereinander Multipletts auftreten, die sich überlagern.
Multipletts erscheinen bei δ=1,9-2,2 ppm, bei 2,6-3,o ppm, bei 3,7-3,9 ppm und ein kleines Signal bei δ=4,3 ppm.
Unter der ersten Signalgruppe liegen die Protonen der Kohlenstoffe 2 und 6; unter der zweiten die des C_3 und C_5. Außerdem liegen unter den letzten Signalen auch die Protonen der Alkohole, was sich aus der Integration des ausgetauschten Spektrums erkennen läßt.
Das C_8-Proton befindet sich ebenfalls unter diesem Multiplett.
Die Protonen der Kohlenstoffe 1 und 9 erscheinen unter dem genannten Multiplett bei δ=3,7-3,9 ppm.
Das Signal für das Methinproton C_7 tritt bei δ=4,3 ppm auf.

Abb. 9: ^{1}H-NMR-Spektrum des Aminoalkohols

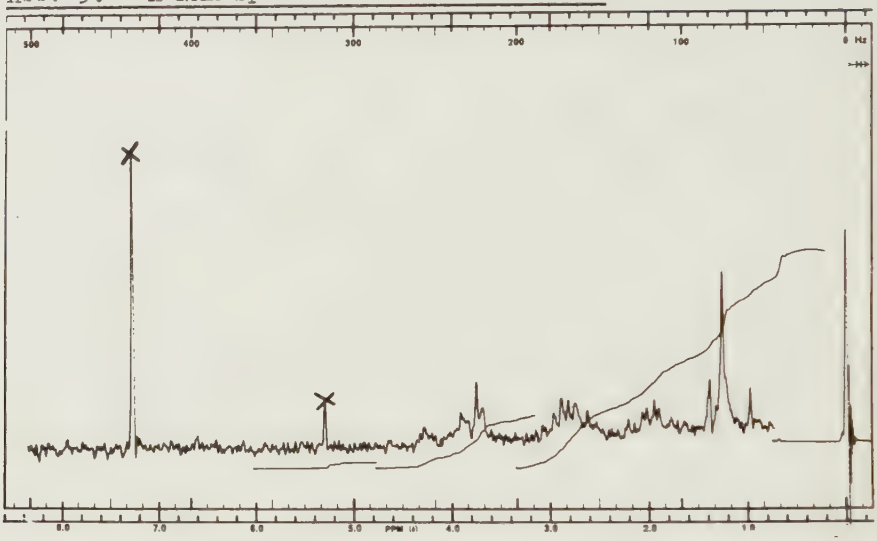
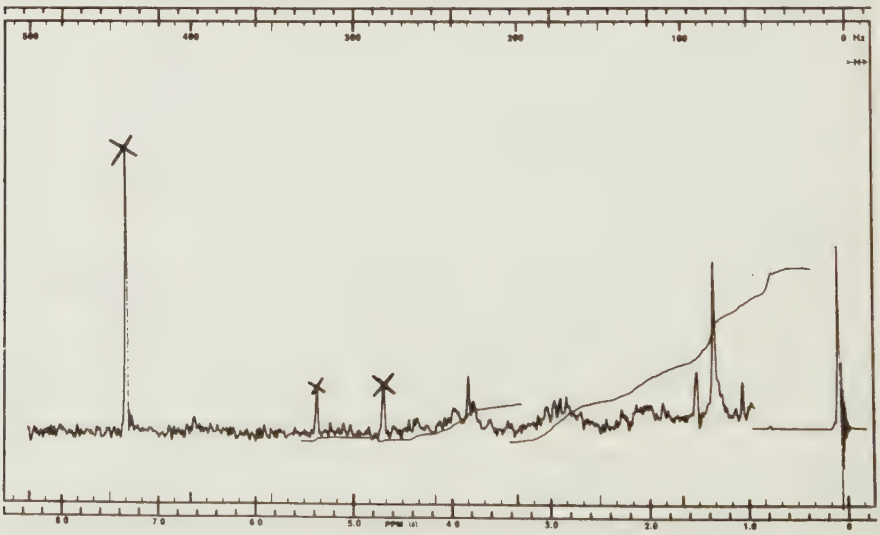


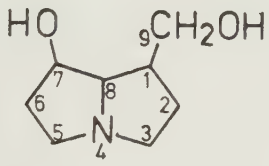
Abb. 1o: ^{1}H-NMR-Spektrum des Aminoalkohols, ausgetauscht.



Der Peak bei 1,3 ppm ist eine Verunreinigung; die angekreuzten Peaks werden durch die Lösungsmittel hervorgerufen.

Das Lösungsmittel für die Aufnahmen ist Deuterochloroform; ausgetauscht wird mit D_2O.

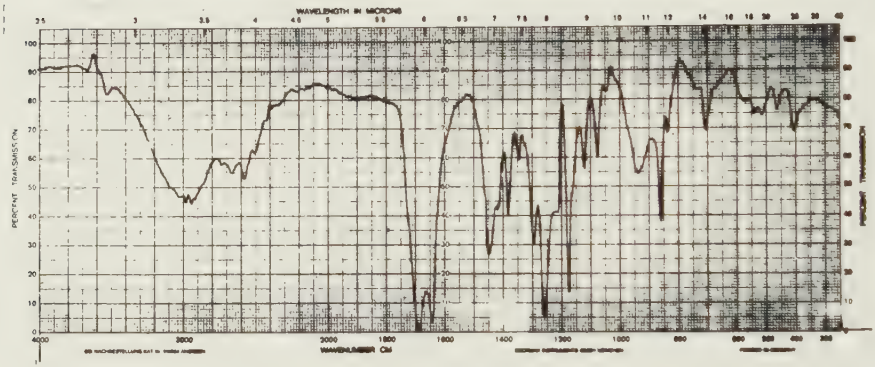
Nach diesen Ergebnissen handelt es sich bei dem vorliegenden Aminoalkohol um Platynecin mit der Summenformel $C_8H_{15}NO_2$.



3.2. Necinsäure

Das IR-Spektrum der Necinsäure ist in Abbildung 11 wiedergegeben.

Abb. 11: IR-Spektrum der Necinsäure

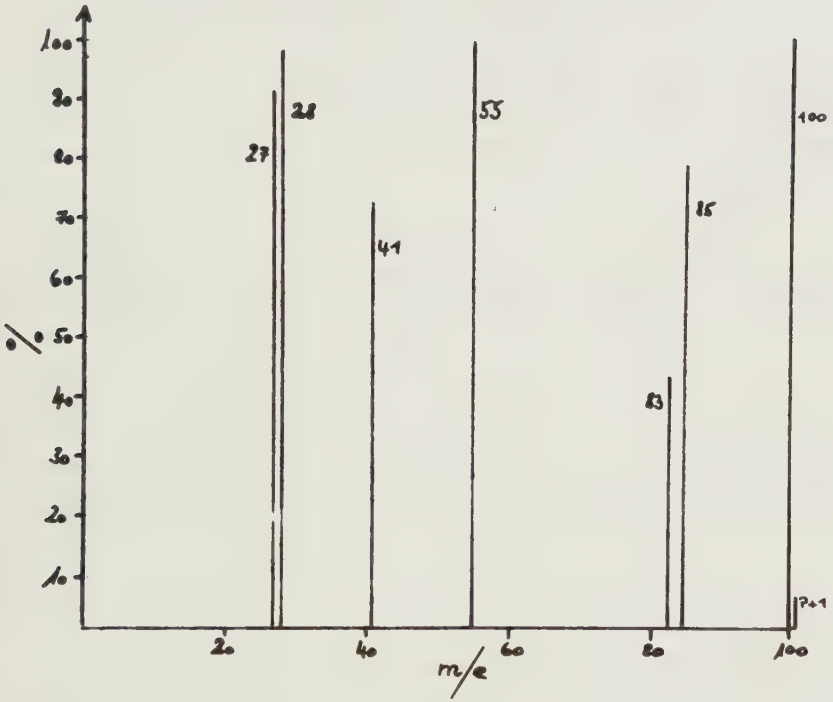


Das Vorliegen einer Karbonsäure wird durch die breite Bande bei 3000 cm^{-1} bewiesen. Die Absorption bei 1690 cm^{-1} ist charakteristisch für α,β-ungesättigte Karbonsäuren.

Für einen olefinischen Anteil spricht die Bande bei 1645 cm^{-1}. Sie erscheint bei unsymmetrisch substituierten Doppelbindungen; eine symmetrische Substitution zeigt im IR-Spektrum keine Adsorption.

Das Massenspektrum der Karbonsäure liefert weitere Hinweise auf die Struktur. Es ist in Abbildung 12 zu sehen.

Abb. 12: Massenspektrum der Necinsäure



Hiernach hat die vorliegende Säure ein Molekulargewicht von 1oo. Aus der Intensität des ersten Peaks nach dem Massenpeak (P+1) läßt sich die Summenformel ableiten. Bei einem Anteil von 5,6 % wird nach massenspektrometrischen Tabellen die Summenformel $C_5H_8O_2$ erkannt[42].

Aus der Art der Fragmentierung kann die Struktur ermittelt werden. Bei Karbonsäuren mit fünf oder mehr Kohlenstoffatomen treten zwei Zerfallsreihen nebeneinander auf[43].

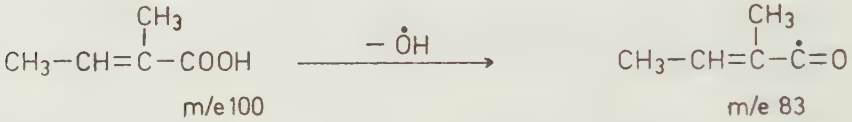
---

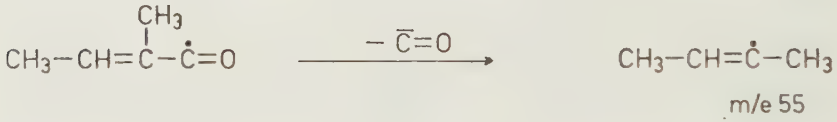
42) R. M. Silverstein und G. C. Bassler, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", Second Edition, 37

43) R. M. Silverstein und G. C. Bassler, "Spectrometric Identification of Organic Compounds, "Second Edition,14,21

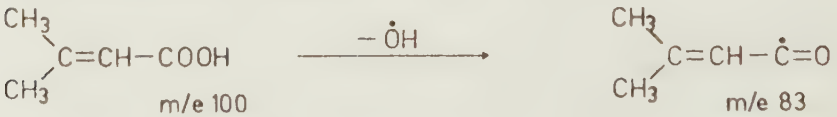
Die eine Fragmentierungsreihe wird eingeleitet durch Zerfall der Karbxylgruppe, die andere durch Zerfall des aliphatischen Anteils. Im anschließenden Formelbild werden die Zerfallreihen von der Karboxylgruppe ausgehend für die nach der Summenformel möglichen Isomeren aufgezeigt.

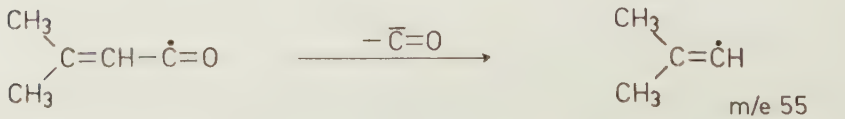
Für die Angelika-, bzw. Tiglinsäure ist folgender Zerfall anzunehmen:

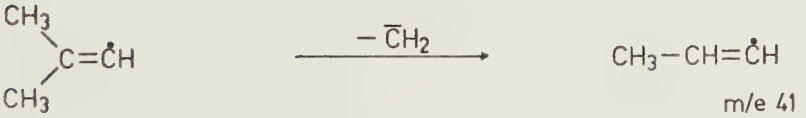


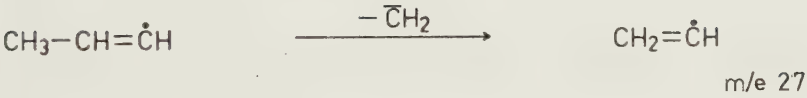


Danach müssen Peaks bei m/e 1oo, 83, 55, 28, 27 auftreten. Für die β,β-Dimethylacrylsäure würde die Fragmentierung folgendes Aussehen haben:





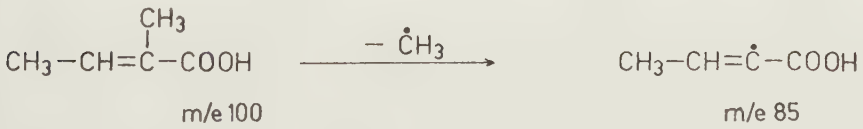


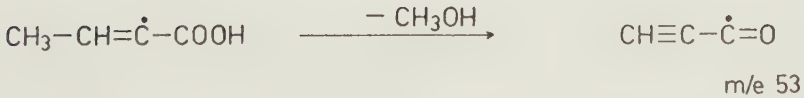


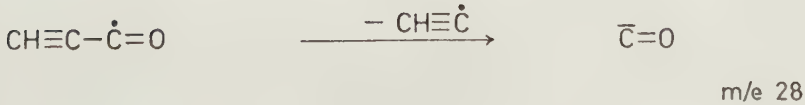
Hierbei sind Peaks bei m/e 1oo, 83, 55, 41 und 27 zu erwarten.

Die nachfolgenden Formelbilder geben die Zerfallsreihen, ausgehend vom aliphatischen Anteil der entsprechenden Karbonsäuren, wieder.

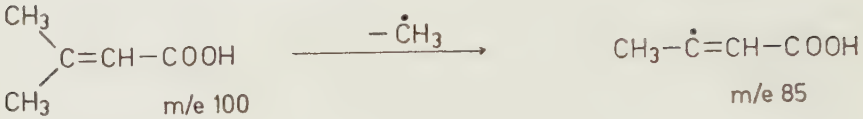
Für die Angelika-, bzw. Tiglinsäure sind Peaks bei m/e 1oo, 85, 53, 28 zu erwarten:

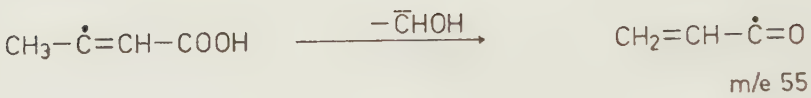


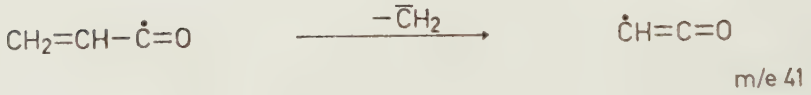


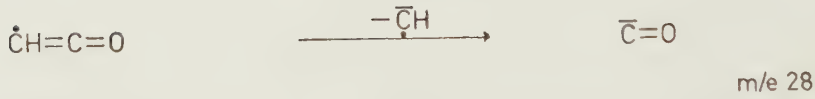


Für die β,β - Dimethylacrylsäure:







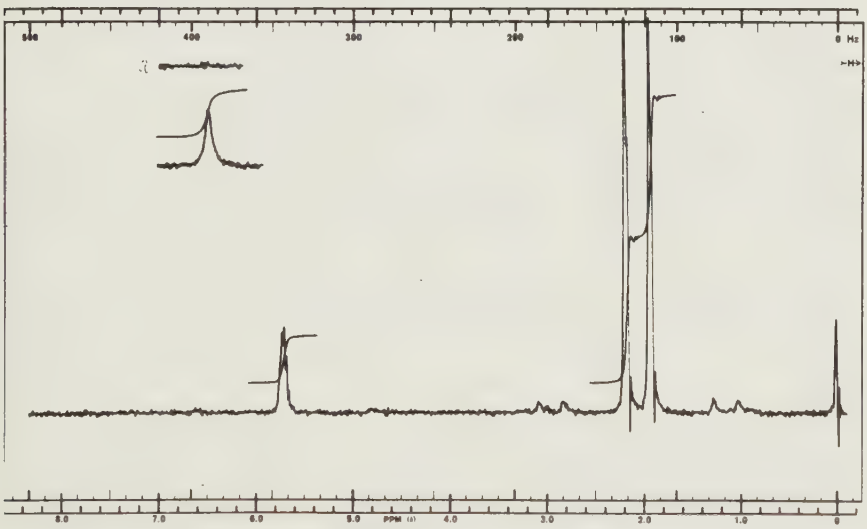


Hiernach werden Peaks bei m/e 1oo, 85, 55, 41 und 28 erwartet. Da beide Zerfallsreihen nebeneinander auftreten, müssen für die Angelika-, bzw. Tiglinsäure, Fragmente mit den Massenzahlen m/e 1oo, 85, 83, 55, 53, 28 und 27 und für die , - Dimethylacrylsäure m/e 1oo, 85,83, 55, 41, 28 und 27 auftreten. Von Bedeutung ist, daß sich innerhalb der Karboxylzerfallsreihe der erste Peak nach dem Massenpeak - er entspricht einer OH-Abspaltung - und der erste Peak nach Abspaltung der gesamten Karboxylgruppe geringere Intensitäten aufweisen.

Danach handelt es sich bei der vorliegenden Necinsäure um die β,β-Dimethylacrylsäure, deren Zerfallsschema sich mit dem im Massenspektrum erhaltenen deckt.

Auch die erwähnte geringere Intensität des ersten und dritten Peaks nach dem Massenpeak innerhalb der Karboxylzerfallsreihe läßt sich deutlich erkennen. Der Peak m/e 41 ist wahrscheinlich durch sein Auftreten in beiden Zerfallsreihen etwas intensiver als der Peak m/e 83.
Den endgültigen Beweis für das Vorliegen von β,β-Dimethylacrylsäure liefert das ^{1}H-NMR-Spektrum das in Abbildung 13 wiedergegeben ist.

Abb. 13: ^{1}H-NMR-Spektrum der Necinsäure



Bei δ=1,95 und 2,2 ppm erscheinen zwei Singuletts, deren Integration jeweils drei Protonen anzeigt; es handelt sich hierbei um zwei Methylgruppen, von denen eine durch das nicht mehr frei drehbare olefinische Proton nach tieferem Feld verschoben ist.

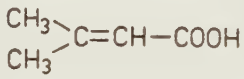
Dieses olefinische Proton tritt bei δ=5,75 ppm auf und liegt damit in dem erwarteten Bereich. Die Aufspaltung durch die Methylgruppe ist noch schwach zu sehen.
Das austauschbare Karboxylproton erscheint bei δ=11,95 ppm im Offsetbereich.

Lösungsmittel für die Aufnahme ist Deuterochloroform; es wird ausgetauscht mit D_2O.

Die Integration ergibt eine Protonenverteilung von 1:1:3:3.

Damit steht die Struktur der Necinsäure des Alkaloids aus Senecio Fuchsii fest.

Es handelt sich um die β,β-Dimethylacrylsäure oder - wie sie in der Chemie der Senecioalkaloide genannt wird - die Senecioinsäure.

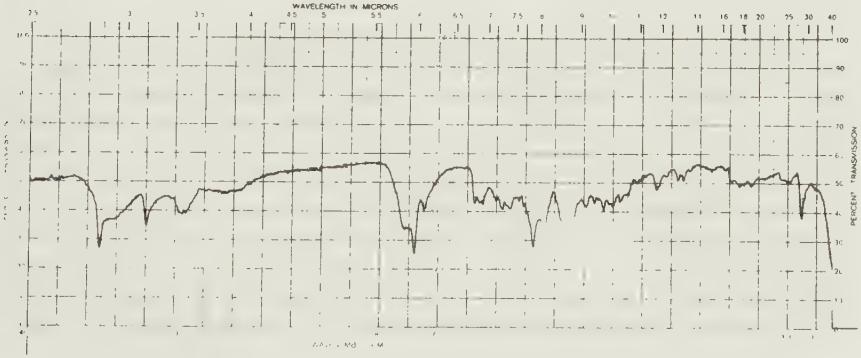


3.3. Alkaloid

Von dem Goldsalz des Alkaloids werden IR-, Massen- und ^1H-NMR-Spektren aufgenommen.

Das IR-Spektrum, das im Mikromaßstab vermessen wird, ist in Abbildung 14 wiedergegeben.

Abb. 14: IR-Spektrum des Alkaloids



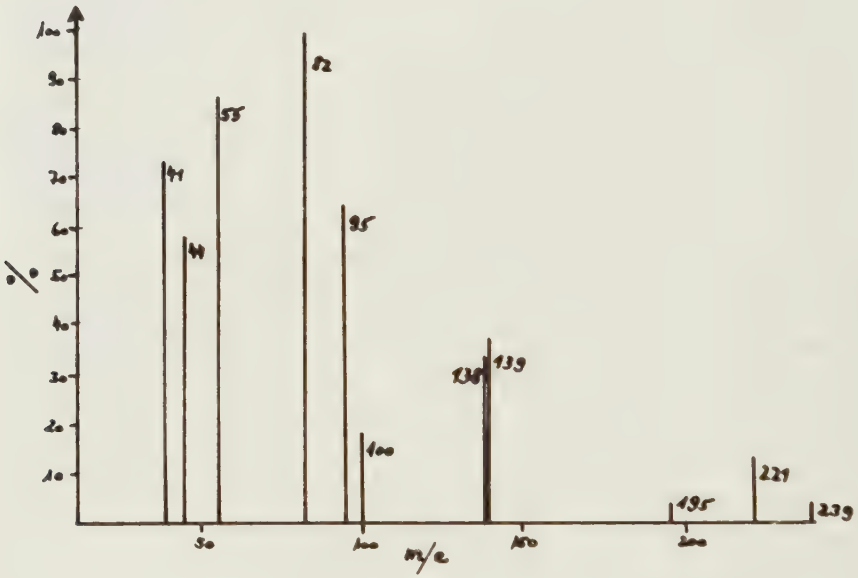
Dieses Spektrum zeigt die charakteristischen Banden der β,β-Dimethylacrylsäure bei 1645 cm^{-1} für die Doppelbindung, bei 1685 cm^{-1} für die α,β-ungesättigte Karbonsäure und bei 1720 cm^{-1} für die Esterfunktion.

Die C-H-Streckschwingung der alkoholischen Gruppe am C_7 des Aminoalkohols liegt bei 1155 cm^{-1} und die dazugehörige OH-Streckschwingung bei 3200 cm^{-1}.

Die Adsorption des tertiären Amins erscheint bei 3520 cm^{-1}.

Das Massenspektrum des Alkaloids ist aus Abbildung 15 ersichtlich.

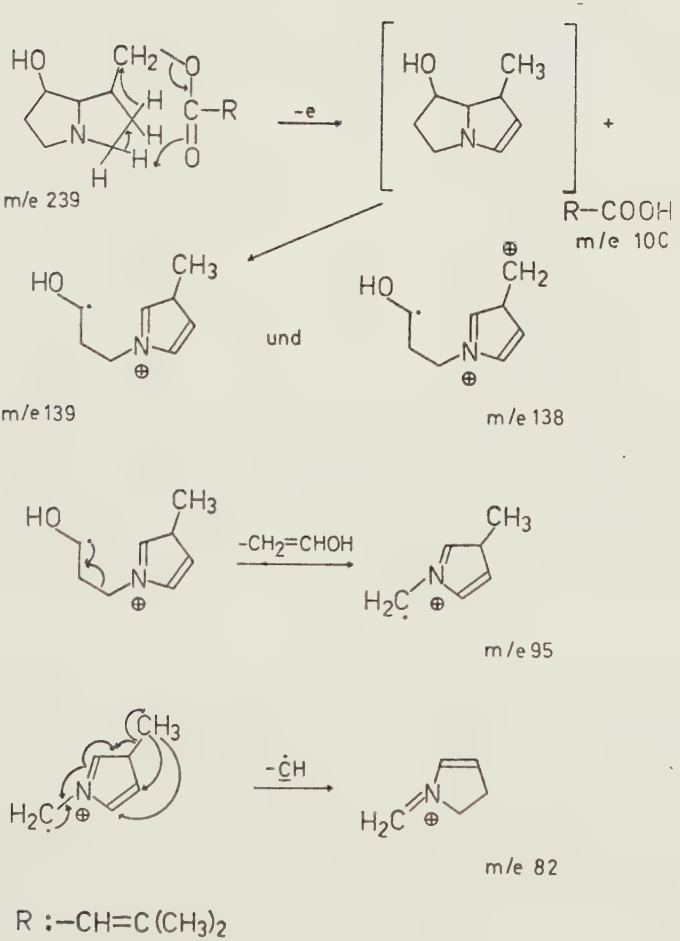
Abb. 15: Massenspektrum des Alkaloids



Wie nach Aufklärung der Einzelkomponenten des Alkaloids erwartet werden konnte, liegt das Molekulargewicht des vorliegenden Senecioalkaloids bei 239.

Durch Kombination der bisher vorliegenden Ergebnisse wird die Summenformel dieses Alkaloids auf $C_{13}H_{21}NO_3$ festgelegt.

Neben dem Molekülpeak sind im Massenspektrum weitere charakteristische Peaks bei m/e 139, 138, 100, 95 und 82 zu finden. Im anschließenden Formelbild ist das Zerfallsschema des Alkaloids wiedergegeben:

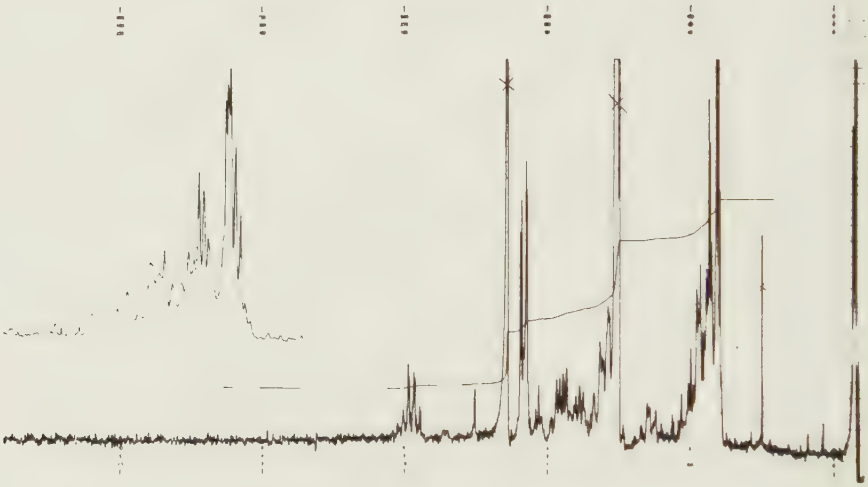

HO
CH2
O
H
C–R
H
H
O
N
H
-e
HO
CH3
N
+
R–COOH
m/e 100
m/e 239
HO
CH3
N
⊕
und
HO
CH2
N
⊕
m/e 139
m/e 138
HO
CH3
N
⊕
-CH2=CHOH
CH3
N
H2C
⊕
m/e 95
CH3
N
H2C
⊕
-CH
N
H2C
⊕
m/e 82

R :–CH=C(CH$_3$)$_2$

Abbildung 16 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum des Alkaloids.

Um eine exakte Zuordnung treffen zu können, wird dieses Spektrum an einem Elektrospin 9o MHz-Gerät aufgenommen. Es werden insgesamt 46o Scans vermessen.

Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektrum des Alkaloids



Bei δ=1,91-93 und 1,99-2,o9 ppm sind die beiden Signale für die Methylgruppen der Necinsäure zu sehen. Das olefinische Proton erscheint bei δ=6,11-6,21 ppm. Deutlicher als bei der Aufnahme der freien Säure ist hier die Aufspaltung zu einem doppelten Quartett, hervorgerufen durch die beiden Methylgruppen, erkennbar. Die beiden Signale der C_9-Methylgruppe erscheinen bei δ=3,8o-3,96 und 4,o2-4,19 ppm.

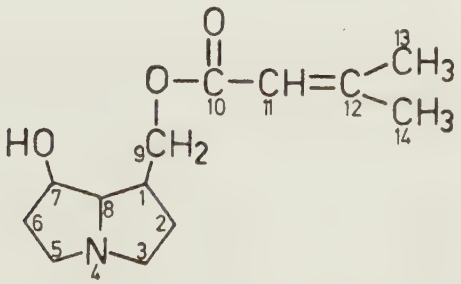
In anschließender Tabelle sind die ppm-Werte der Protonen des Pyrrolizidinringes zusammengefaßt:

Tabelle 3:

δ = ppm	Protonen am :
4,64	C_1
4,55	C_7
1,9o und 2,o1	2 x C_2
1,91-93 und 1,99-2,o1	2 x C_6
2,1o und 2,68-72	2 x C_3
2,3o und 2,88-92	2 x C_5
3,42-5o	C_8

Das Proton der Hydroxylgruppe am C_7 erscheint nicht im Spektrum, da durch die Verwendung von Deuteromethanol als Lösungsmittel bereits ein Austausch stattgefunden hat.

Nach diesen Ergebnissen steht die Struktur des aus Senecio Fuchsii isolierten Pyrrolizidinalkaloids fest.

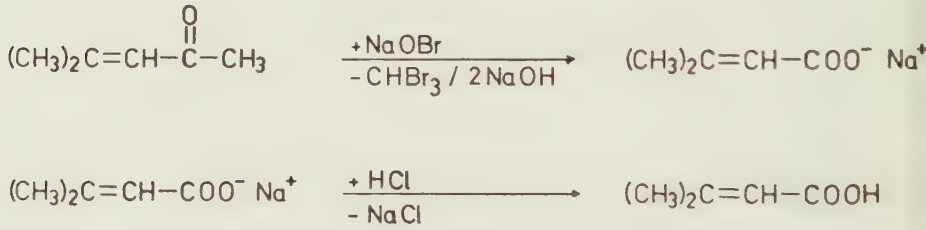


Die Kombination von Platynecin und Senecioinsäure ist bislang noch nicht beschrieben worden und wird erstmals in dem Alkaloid aus Senecio Fuchsii aufgefunden.

Für dieses Alkaloid wird der von MÜLLER vorgeschlagene Name "Fuchsisenecionin" übernommen.

4. Synthese

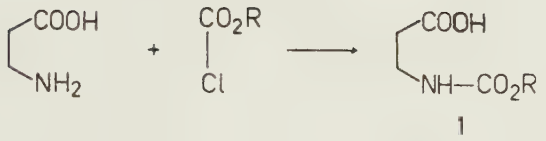
Da die Isolierung des Fuchsisenecionins aus biologischem Material einen großen Aufwand erfordert, wird ein Syntheseweg zur Darstellung präparativer Mengen erarbeitet.
Synthesen von Pyrrolizidinalkaloiden verlaufen über die getrennte Herstellung von Necinsäure und Aminoalkohol. Die Einzelkomponenten werden anschließend verestert.
Die Säure des Fuchsisenecionins, die Senecioinsäure, kann leicht durch die Haloformreaktion aus Mesityloxid hergestellt werden[44]. Dazu wird das Keton mit Hypobromit im alkalischen Milieu zur Säure oxidiert, mit Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Zur Reinigung wird destilliert.
Das nachfolgende Formelbild gibt die Reaktion wieder:



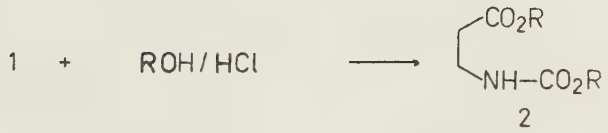
Der Aminoalkohol, der im Fuchsisenecionin als Platynecin erkannt wurde, läßt sich über Retronecin herstellen. Die Struktur der beiden Basen unterscheidet sich nur durch eine Doppelbindung in 1,2-Stellung im Retronecin.
Eine Synthese für Retronecin wurde bereits von GEISSMAN und WAISS beschrieben[45] und von CLARK-LEWIS und MORTIMER überarbeitet[46].
Diese 11-stufige Synthese ist im nachfolgenden Reaktionsschema wiedergegeben:

---

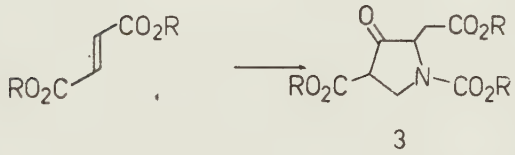
44) Organikum, 12. Auflage, 4o6 (1973)
45) T. A. Geissman und A. C. Waiss, J. Org. Chem., 27, 139 (1962)
46) J. W. Clark-Lewis und P. J. Mortimer, J. Chem. Soc., 196o, 189



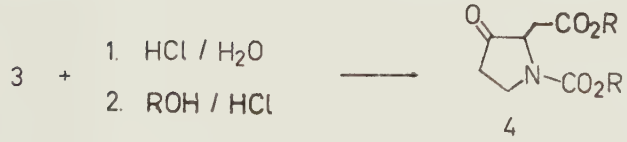
1



2



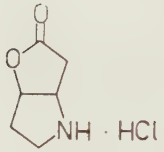
3



4

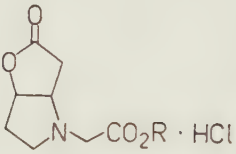
5

6

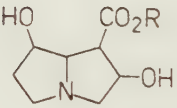
6 + HCl ⟶ 

7

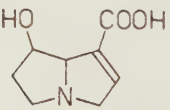
7 +

⟶ 

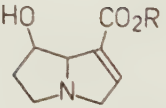
8

8 + 1. KOR, 2. H_2 / Pt ⟶ 

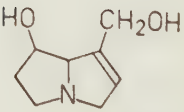
9

9 + $Ba(OH)_2$ ⟶ 

10

10 + ROH / HCl ⟶ 

11

11 + $LiAlH_4$ ⟶ 

12

R = C_2H_5

Wie beide Arbeitsgruppen übereinstimmend feststellten, kommt dem N-Äthoxicarbonyl-3-pyrrolidinol-2-äthylazetat (4) innerhalb der Retronecinsynthese eine Schlüsselstellung zu.

Ein anderer Weg unter Umgehung dieser Substanz konnte nicht gefunden werden.

Die von GEISSMAN und WAISS vorgeschlagene Synthese wird nachgearbeitet. Hierbei zeigt sich, daß wegen der vielen Syntheseschritte nur eine sehr geringe Ausbeute an Retronecin erhalten wird.

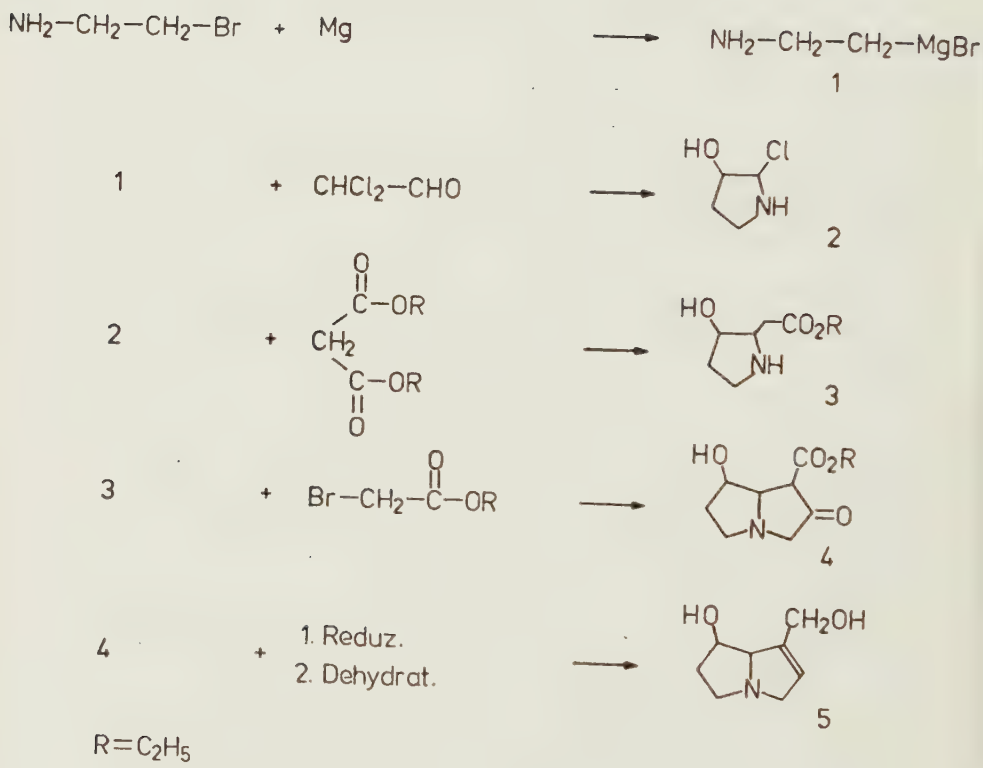
Aus diesem Grunde wird ein einfacherer Syntheseweg erarbeitet. Da jede Retronecinsynthese über das oben genannte Pyrrolidinon ablaufen muß, wird ein Weg gesucht, der direkt zu 4, bzw. dessen Reduktionsprodukt führt.

Eine Möglichkeit zur Herstellung von 2-Chlor-3-pyrrolidinol könnte in einer Grignard-Reaktion von Bromäthylamin mit Dichloracetaldehyd gesehen werden. Durch geeignete Lösungsmittel- und Temperatureinflüsse soll versucht werden, diese Substanz zu erhalten.

Dieses Pyrrolidinol könnte nach Umsetzung mit Malonsäurediäthylester und anschließender Decarboxilierung 2-Äthylazetat-3-pyrrolidinol ergeben.

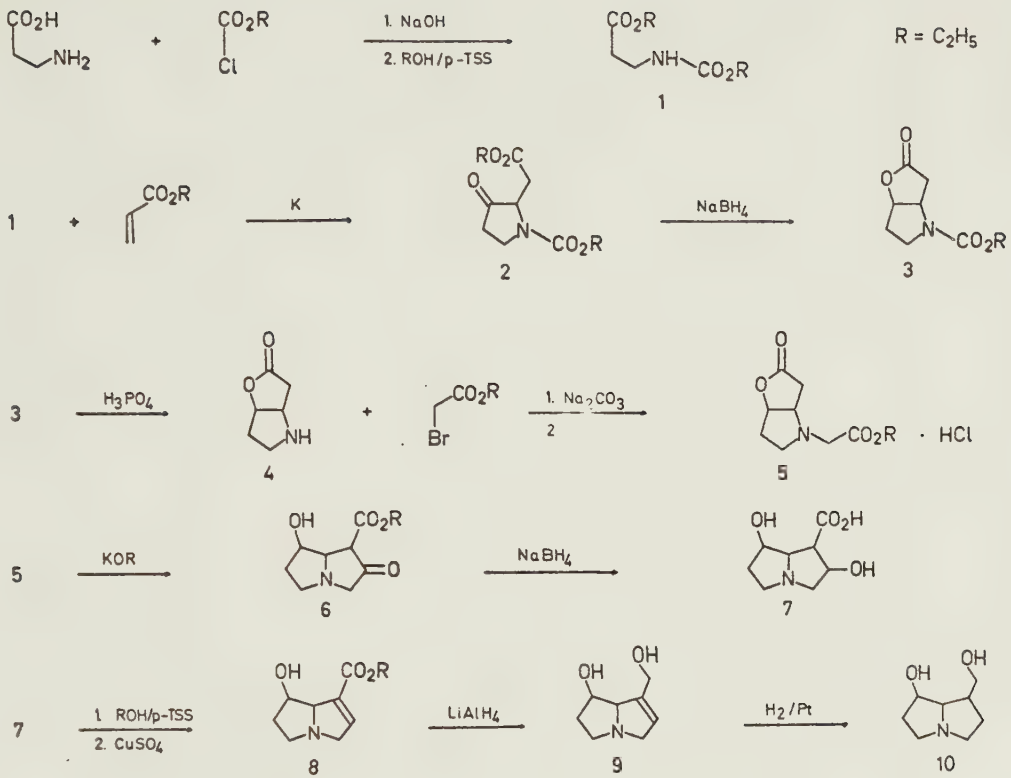
Das so erhaltene Pyrrolidinol kann mit Bromessigsäureäthylester zu einem Pyrrolizidinon cyclisiert werden, das nach Reduktion und Dehydratisierung Retronecin liefert.

Im anschließenden Reaktionsschema sind die einzelnen Schritte aufgezeigt:



Trotz Abänderung der verschiedensten Reaktionsbedingungen führte die Grignard-Reaktion nicht zur gewünschten Substanz. Es wird nun ein anderer Syntheseweg versucht.
In Anlehnung an die bereits beschriebene Retronecinsynthese wird β-Alanin als Ausgangsverbindung eingesetzt.

Wie aus folgendem Formelbild zu sehen ist, soll Platynecin in sechs Reaktionsschritten erhalten werden:


1. NaOH
2. ROH/p-TSS
R = C2H5
1
K
2
NaBH4
3
H3PO4
4
1. Na2CO3
2
5
· HCl
KOR
6
NaBH4
7
1. ROH/p-TSS
2. CuSO4
8
LiAlH4
9
H2/Pt
10

In einer Eintopfreaktion wird β-Alanin zunächst zum N-Äthoxicarbonyl-3-aminopropionsäureäthylester (1) umgesetzt. Mit Kalium läßt sich dieser Ester zu dem bereits erwähnten N-Äthoxicarbonyl-3-pyrrolidinon-2-äthylazetat (2) cyclisieren.

Durch Reduktion mit Natriumborhydrid ist hieraus das Lacton 3 zugänglich.
In einer weiteren Eintopfreaktion kann über Lacton 4 das γ-Lacton der N-Carbäthoximethyl-3-pyrrolidinol-2-essigsäure (5) erhalten werden.
Hieraus ist über die Zwischenstufen 6 und 7 direkt das 8-Hydroxy-1-äthoxicarbonyl-1,2-dehydropyrrolizidin (8) erhältlich. Aus diesem Ester kann Retronecin (9) durch Reduktion und Platynecin (1o) durch Reduktion und Hydrierung der Doppelbindung gewonnen werden.
Die aufgezeigte Synthese wird durchgeführt und Platynecin in präparativen Mengen erhalten.

Im Anschluß daran soll Platynecin mit Senecioinsäure verestert werden, um so zu einem synthetischen Fuchsisenecionin zu gelangen.
Die saure Veresterung mit Schwefelsäure oder die azeotrope Veresterung dieser beiden Komponenten gelingt nicht, da sich der Aminoalkohol zersetzt.

Es wird nun eine Veresterung über die Säureimidazolidmethode versucht[47 a-d].

Sie beruht darauf, daß in indifferenten Lösungsmitteln N,N'-Carbonyl-diimidazol im äquimolaren Verhältnis mit Karbonsäuren zu dem entsprechenden Imidazolid reagiert. Dieses kann

---

47) a) R. Paul und G. W. Anderson, J.Am.Chem.Soc., 82,4596(196o)
b) H. A. Staab, Angew. Chem., 71, 194 (1959)
c) H. A. Staab, W. Rohr und A. Mannschreck, Angew. Chem., 73, 143 (1961)
d) H. A. Staab und A. Mannschreck, Chem. Ber., 95, 1284 (1962)

mit gleichen Mengen Alkohol und geringen Mengen Alkoholat als Katalysator zum Ester umgesetzt werden.

Das aufgeführte Formelbild gibt diese Reaktion wieder:

Die Veresterung von Platynecin mit Senecioinsäure unter den angegebenen Bedingungen konnte bis jetzt nur dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

In späteren Versuchen soll diese Methode, die normalerweise gute Ausbeuten liefert, verbessert werden.

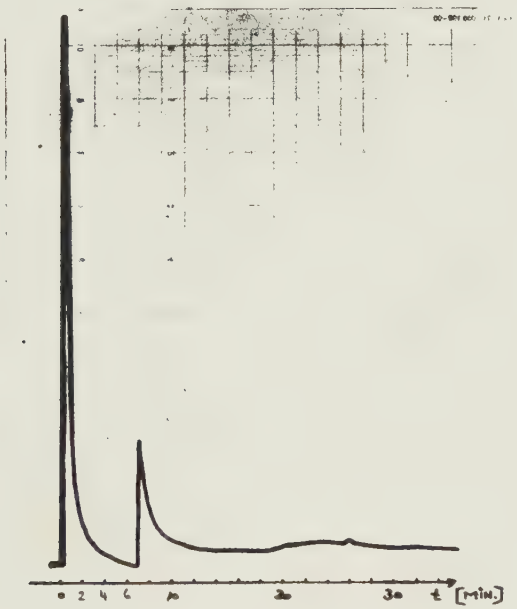
5. Analytik

Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden noch heute Arzneispezialitäten, die Senecio Fuchsii-Wirkstoffe enthalten, in der Humanmedizin verwendet.

Da es sich bei den Pyrrolizidinalkaloiden um physiologisch stark wirkende Substanzen handelt, wird im Rahmen dieser Arbeit eine analytische Methode dargelegt, die eine schnelle und sichere Bestimmung des Fuchsisenecionins ermöglicht.

Zur allgemeinen Charakterisierung der Substanz kann die in Kapital 2.3.2. beschriebene Dünnschichtchromatographie herangezogen werden.
Danach können die entwickelten DC-Platten einmal mit Dragendorff's Reagenz auf Alkaloide und nach DANN auf Pyrrolizidine geprüft werden.
Zum speziellen Nachweis des Fuchsisenecionins wird die in Kapitel 2.3.6. beschriebene Gaschromatographie verwendet. Unter den in diesem Kapital beschriebenen GC-Bedingungen spricht das Auftreten eines Peaks mit dem Rt-Wert von 35,2 Minuten für Fuchsisenecionin.
In die Untersuchung mit einbezogen wird die Droge Senecio nemorensis, da Senecio Fuchsii, wie eingangs beschrieben, eine ihrer Unterarten ist und beide Drogen gleiche medizinische Indikation aufweisen. Aufgrund der engen botanischen Verwandtschaft liegt die Vermutung nahe, daß in beiden Drogen derselbe Inhaltsstoff vorhanden ist.
Eine GC-Analyse von Senecio nemorensis bestätigt diese Vermutung.
Um die in den Chromatogrammen weiter auftretenden Peaks als mögliche Artefakte des Alkaloids identifizieren zu können, wird der, wie in Kapital 3 (S. 42) beschrieben, isolierte Aminoalkohol Platynecin in gleicher Weise einer GC-Analyse unterworfen.
Das in Abbildung 17 wiedergegebene Chromatogramm zeigt das Ergebnis:

Abb. 17: Gaschromatogramm des Platynecins



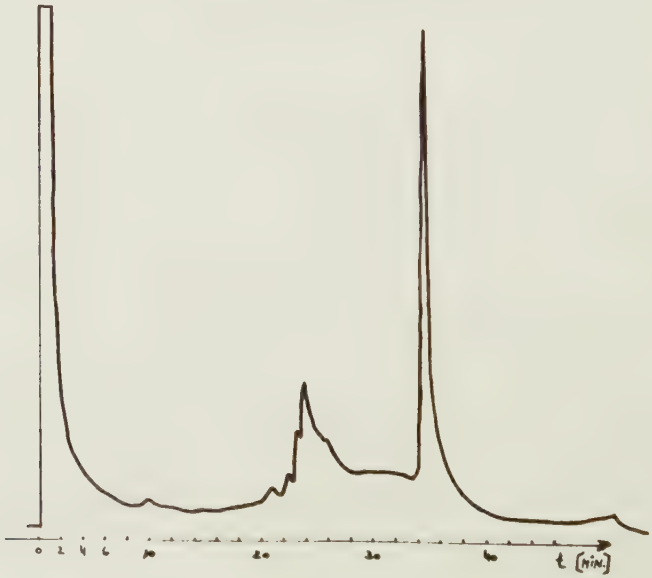
Danach weist Platynecin den Rt-Wert von 7,3 Minuten auf. Da bei einer Behandlung des Urextraktes unter schonenden Bedingungen dieser Peak nicht auftritt, scheint eine Verseifung des Alkaloids nicht einzutreten.

Der im Urextrakt von Senecio Fuchsii erhaltene Peak mit dem Rt-Wert von 21,8 Minuten dagegen muß dem N-Oxid des Alkaloids zugeordnet werden, was durch folgende Probe bewiesen wird: Ein unter Luftausschluß bereiteter Drogenextrakt zeigt im Gaschromatogramm bei diesem Rt-Wert keinen oder nur einen sehr schwachen Peak. Wird dieser Extrakt danach unter Lufteinwirkung einige Zeit stehengelassen, tritt bei einer Wiederholung der Analyse dieser Peak in starkem Maße auf, wogegen der Fuchsisenecionin-Peak im gleichen Verhältnis an Intensität abnimmt.

5.1. Untersuchung von Handelspräparaten

Senecio Fuchsii ist als Droge unter dem Namen Kruziflora-Tee^{R} im Handel*.
Wegen seiner blutzuckersenkenden Wirkung findet er bei Diabetes Verwendung. Er wird vom Hersteller als alkaloidfrei, ungiftig und frei von schädlichen Nebenwirkungen bezeichnet.
Eine Originalpackung enthält 15o Gramm der getrockneten Droge. Der Inhalt einer Packung wird analysiert.
Die Extraktion der Alkaloidinhaltsstoffe nach dem in Kapitel 2.2. beschriebenen Schema erbringt ein Gramm Rohextrakt.
Dieser Extrakt wird dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Reaktion auf der DC-Platte mit Dragendorff's Reagenz verläuft positiv.
Ein Teil des Extraktes wird in Methanol gelöst, über Florisil vorgereinigt und hiervon fünf µl gaschromatographisch untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen.

Abb. 18: Gaschromatogramm von Kruziflora^{R}



* A. Weltecke, Bochum-Langendreer

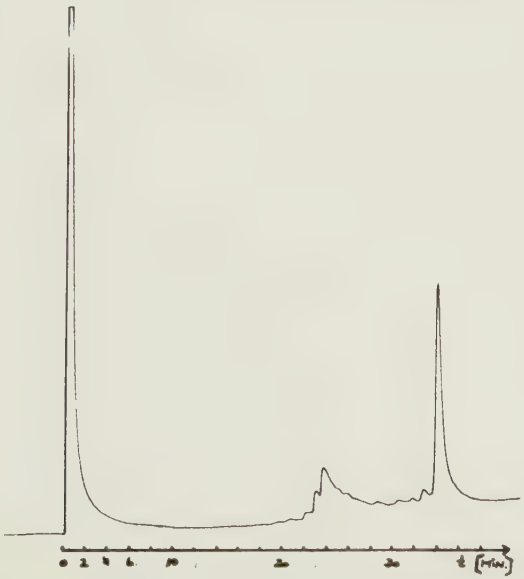
Erwartungsgemäß wird im vorliegenden Handelspräparat Fuchsisenecionin als Hauptbestandteil gefunden.

Mit einbezogen in die Untersuchung wird der Kreuzblütlertee^{R}, der die Droge Senecio nemorensis enthält*.

Dieser Tee wird wie Kruziflora^{R} als Diabetikertee angewendet. Eine Originalpackung Kreuzblütlertee^{R} - entsprechend 125 Gramm getrocknete Droge - wird extrahiert. Es werden ca. o,5 Gramm Alkaloid-Rohextrakt erhalten. Die DC-Analyse ergibt einen positiven Nachweis mit Dragendorff's Reagenz.

Nach Vorreinigung des methanolischen Extraktes mit Florisil wird mit fünf µl dieser Lösung das in Abbildung 19 wiedergegebene Gaschromatogramm erhalten.

Abb. 19: GC von Kreuzblütlertee^{R}



Auch hier liegt als Hauptbestandteil das Fuchsisenecionin vor.

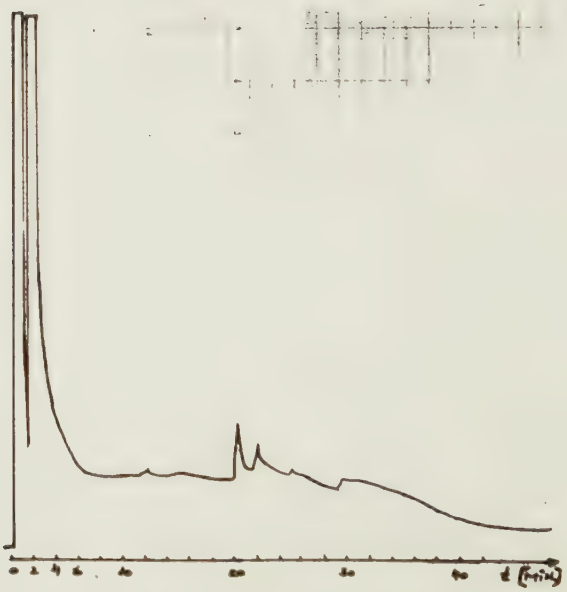
* Fr. K. Ogrzey, Jülich

Unter der Bezeichnung Senecion-Tropfen^{R} befindet sich ein Präparat im Handel, das Senecio Fuchsii-Wirkstoffe enthält*.

Laut Packungsdeklaration sollen 1oo Gramm Tropfen 95 Gramm eines Fluid-Extraktes aus Senecio Fuchsii und fünf Gramm Vitamin C enthalten. Der Alkaloidgehalt ist auf 1,5 Milligramm pro Kubikzentimeter standardisiert.

Die Tropfen sollen bei "kapillären Schleimhautblutungen, arteriellen Blutungen, Hämoptysis, Operationsnachblutungen und als Antidot bei Dicumarolüberdosierungen" Verwendung finden. Da hier bereits ein Alkaloidextrakt vorliegt, wird ein Aliquot dieser Tropfen direkt gaschromatographisch untersucht. Beim Einsatz von 5 µl erhält man ein Chromatogramm, das in Abbildung 2o wiedergegeben ist.

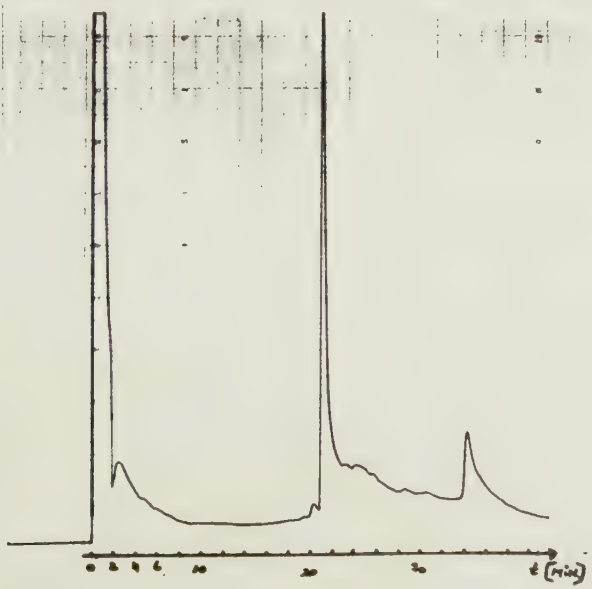
Abb. 2o: Gaschromatogramm von Senecion^{R}



* Dr. G. Klein, Zell-Harmesbach/Schwarzwald

Bei den Rt-Werten von 2o,o und 21,8 Minuten tritt je ein schwacher Peak auf. Der letzte Peak deutet auf das Vorliegen des N-Oxides von Fuchsisenecionin hin.
Aufgrund der geringen Intensität der Peaks liegt die Vermutung nahe, daß die vorhandenen Substanzmengen unterhalb der Erfassungsgrenze des Gaschromatographen liegen.
Danach werden, um die Probe genauer zu gestalten, die Tropfen folgendermaßen behandelt:
Unter schonenden Bedingungen werden 2o ml Tropfen am Rotationsverdampfer vorsichtig zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 2 %-iger HCl aufgenommen und mit Äther extrahiert. Die saure Lösung wird ammoniakalisch gemacht und mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten Methylenchloridauszüge werden wiederum vorsichtig eingedampft und der danach verbleibende Rückstand in fünf Milliliter Methanol aufgenommen. Die gesamte Behandlung wird unter Stickstoffbegasung durchgeführt.
7,5 µl dieser methanolischen Lösung werden erneut gaschromatographisch untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 zu sehen.

Abb. 21: GC der aufgearbeiteten Senecion-Tropfen^{R}



Durch die geschilderte Behandlung der Tropfen wurde sowohl eine Reinigung als auch eine sechsfache Anreicherung der vorhandenen Alkaloide erzielt.

Aus dem Chromatogramm geht hervor, daß die enthaltenen Alkaloide nun in den Erfassungsbereich des Chromatographen gebracht wurden.

Das in den Senecion-Tropfen^{R} vermutete Fuchsisenecionin wird nun erfaßt, obgleich der größte Teil des Alkaloids höchstwahrscheinlich als N-Oxid vorliegt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit Hilfe der beschriebenen gaschromatographischen Analyse der Nachweis von Fuchsisenecionin in Arzneispezialitäten leicht geführt werden kann. Die Dauer einer so durchgeführten Untersuchung, einschließlich der Reinigung über Florisil, beträgt ca. 3o Minuten. Die Nachweisgrenze des Gaschromatographen für Fuchsisenecionin wird folgendermaßen festgestellt:

Die Fläche der Chromatogramm-Peaks der ersten Florisil-Fraktion des Urextraktes (S. 37, Abb. 4) wird integriert. Der Gehalt an Fuchsisenecionin beträgt hier 28 %. Der Trockenrückstand der Fraktion entspricht 2,2 mg.

Zwei Mikroliter einer Lösung des Trockenrückstands in zehn Milliliter Methanol ergeben einen gerade noch erkennbaren Peak.

Danach liegt die untere Erfassungsgrenze des Gaschromatographen bei o,15 Mikrogramm Fuchsisenecionin.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung, Strukturaufklärung und Partialsynthese des Alkaloidinhaltsstoffes aus Senecio Fuchsii.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

1. Es wird eine Methode angegeben, die es ermöglicht, einen Alkaloid-Rohextrakt aus der Droge unter schonenden Bedingungen zu erhalten.
2. Ein Alkaloid wird aus dem Rohextrakt nach entsprechender Vorbehandlung gaschromatographisch isoliert.
3. Die Struktur dieses Alkaloids wird an Hand von IR-, Massen- und ^{1}H-NMR-Spektren aufgeklärt.
   Danach handelt es sich um ein Esteralkaloid aus der Pyrrolizidinreihe. Es besteht aus der Necinsäure β,β-Dimethylacrylsäure und dem Aminoalkohol Platynecin.
4. Es wird eine verbesserte Synthese für den Aminoalkohol Platynecin erarbeitet.
5. Es wird eine analytische Methode beschrieben, die einen schnellen und sicheren Nachweis des genannten Alkaloids in Arzneispezialitäten erlaubt.

7. Experimenteller Teil

7.1. Allgemeine Angaben

Bei der Dünnschichtchromatographie wird als Adsorbens Kieselgel mit Fluoreszenzindikator PF 254 der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

Bei der Dickschichtchromatographie kommt dieses Kieselgel ebenfalls zur Anwendung.

Bei der Säulenchromatographie dient als stationäre Phase Kieselgel 60, ca. 60 Å, und Florisil, Fa. Merck.

Zur Gaschromatographie steht ein Gerät, Typ Aerograph 2800, der Fa. Varian, Darmstadt, zur Verfügung. Er kann wahlweise zur analytischen als auch zur präparativen Trennung benutzt werden. Ein Linienschreiber derselben Firma, Typ A 25, dient der Registrierung.

Als Trennsäulen werden jeweils Stahlsäulen gepackt mit 3 % SE 30 auf Varaport 30, 80/100 mesh, eingesetzt. Bei der analytischen Trennung hat diese Säule eine Länge von 1,8 m und einen Durchmesser von 3 Millimetern. Bei der präparativen Trennung bleibt die Säulenlänge gleich; nur der Durchmesser beträgt hier 9,5 Millimeter.

Die IR-Spektren werden mit den Spektrometern IR-33 und IR-20 A der Fa. Beckmann, München, aufgenommen. Die Substanzen werden als KBr-Preßlinge, bzw. -Filme, vermessen.

Die ^{1}H-NMR-Spektren werden mit dem Spektrometer T 60, Fa. Varian, aufgenommen. Lösungsmittel sind Deuterochloroform und Trifluoressigsäure.

Das Spektrum des Pyrrolizidinalkaloids wird mit einem Gerät Elektospin 90 MHz, Fa. Bruker, ausgeführt. Die Anzahl der Meßdurchläufe beträgt 460; Lösungsmittel ist hier Deuteromethanol.

Als innerer Standard dient in allen Messungen Tetramethylsilan. Ausgetauscht wird immer mit D_2O.

Die angegebenen ppm-Werte entsprechen der δ-Skala

Die Massenspektren werden mit einem MAT-Gerät, Typ 731, Bremen, aufgenommen. Die Emission beträgt 1oo eV, die Quellentemperatur 3oo° C und die Probentemperatur 2oo° C.

Die Schmelzpunkte werden mit einem Kofler-Mikroskopgerät, Fa. Reichert, Wien, bestimmt und sind unkorrigiert.

7.2. Spezielle Angaben

Zur Bereitung eines Drogenauszuges für Voruntersuchungen wird eine Stada-Extraktionslösung folgender Zusammensetzung herangezogen:

Glycerin	36
Ammoniak 25 %	3o
Äthanol 9o %	662
Wasser	412

Als Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie kommen zur Anwendung:

	1)	Chloroform	5o (Vol.%)
		Aceton	3o
		Äthanol	1o
		Ammoniak 25 %	1o
	2)	Methylenchlorid	85 (Vol.%)
		Methanol	14
		Ammoniak 25 %	1
azeotrop:	3)	Methylenchlorid	92,7 (Gew.%)
		Methanol	7,3
azeotrop:	4)	sek. Butanol	15,4 (Gew.%)
		Benzol	84,6
isobar:	5)	Trichloräthylen	75 (Vol.%)
		Isopropylazetat	15
		Triäthylamin	1o
isobar:	6)	Benzol	75 (Vol.%)
		2-Butanon	15
		n-Butylamin	1o

Zur Detektion der DC-Platten dient Dragendorff's Reagenz:

Dragendorff A	Wismutnitrat	o,85 gr
	Essigsäure	1o ml
	Wasser	4o ml
Dragendorff B	Kaliumjodid	8 gr
	Wasser	2o ml

Bei Bedarf werden Dragendorff A und B zu gleichen Teilen gemischt.

Zur Detektion von Pyrrolizidinen nach der modifizierten Probe nach DANN[3o] werden folgende Reagenzien benutzt:

Wasserstoffperoxidreagenz	Wasserstoffperoxid	3o %
Acetanhydridreagenz	Acetanhydrid	1 Teil
	Benzin (8o-1oo° C)	4 Teile
	Benzol	5 Teile
Ehrlich's Reagenz	p-Dimethylaminobenz-aldehyd	1 gr
	Äthanol 9o %	7o ml
	Diäthylenglykolmono-äthyläther	3o ml
	Salzsäure 37 %	1,5 ml

Als Fließmittel für die Säulenchromatographie werden verwendet:

1)	Chloroform	5o (Vol.%)
	Aceton	3o
	Ammoniak 25 %	5
	Äthanol	bis zur klaren Lösung
2)	Benzol	75 (Vol.%)
	2-Butanon	15
	n-Butylamin	1o

Die Bedingungen für die gaschromatographische Trennung sind:

1) analytisch:

Injektortemperatur	215° C
Detektortemperatur	25o° C
Anfangstemperatur	4o° C
Endtemperatur	23o° C

sieben Programmstufen à neun Minuten; davon vier mal fünf Grad, ein mal ohne Heizung, zwei mal vier Grad.
Der Stickstoffluß beträgt 82 ml pro Minute.
Die Einspritzung erfolgt mit einer Unimetricsspritze, Dosiergenauigkeit 1-1o µl.

2) präparativ:

Injektortemperatur	17o° C
Detektortemperatur	25o° C
Anfangstemperatur	4o° C
Endtemperatur	23o° C
Kollektortemperatur	23o° C

Programmstufen wie vorher.
Der Stickstoffluß beträgt 41 ml pro Minute.
Die Einspritzung erfolgt durch eine mit Preßluft betriebene Kolbenhubpumpe, die automatisch gesteuert wird.

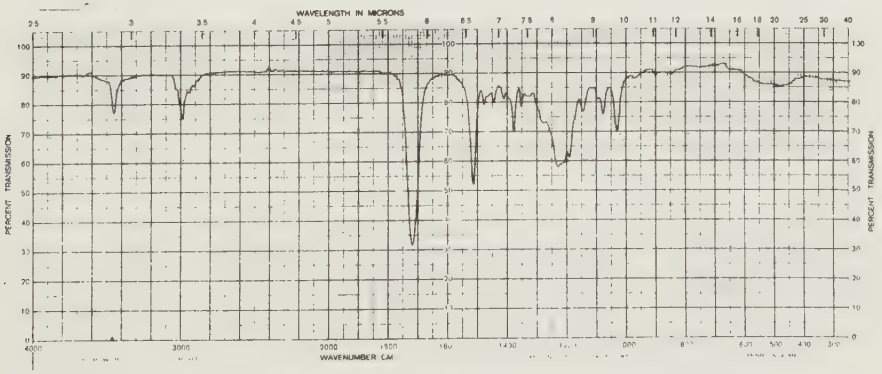
7.3. Beschreibung der Versuche zu 4.

N-Äthoxicarbonyl-3-aminopropionsäureäthylester (1)

89 gr ß-Alanin (1,o Mol) werden mit 4o gr Natriumhydroxid (1,o Mol) in 25o ml Wasser gelöst. Die Lösung wird unter Rühren und Eiskühlung gleichzeitig mit 1o8 gr Chlorameisensäureäthylester (1,o Mol) und 4o gr Natriumhydroxid (1,o Mol) in 25o ml Wasser gelöst tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe wird mit Schwefelsäure angesäuert und fünf mal mit 1oo ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wird mit 5 gr p-Toluolsulfonsäure und 8o,5 gr Äthanol (1,75 Mol) versetzt und am Wasserabscheider gekocht.

Sobald alles Wasser abgeschieden ist, wird das Chloroform abdestilliert und der ölige Rückstand im Vakuum durch Destillation rektifiziert. Die Ausbeute beträgt 17o,1 gr (9o % d. Th.). $Kp_{0,3}$: 96-99° C

Abb. 22:



In Abbildung 22 ist das IR-Spektrum der Substanz 1 zu sehen. Es zeigt eine starke Bande bei 172o cm^{-1} für die Esterfunktion. Weiterhin sind die Banden bei 1515 und 345o cm^{-1} für das sekundäre Amin charakteristisch.

Abb. 23:

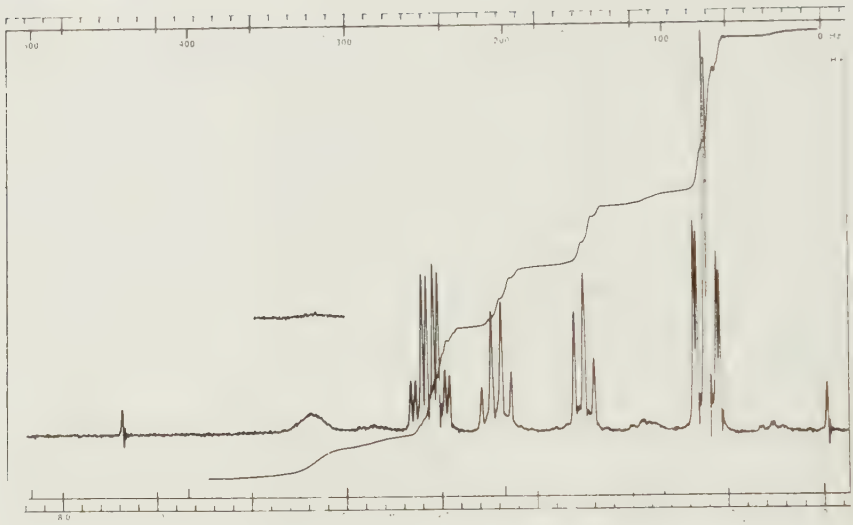


Abbildung 23 zeigt das NMR-Spektrum von 1.
Es sind zwei deutliche Tripletts bei 1,15 ppm, zwei Quartetts bei 4,15 ppm für die beiden Äthylgruppen zu sehen. Außerdem lassen sich zwei CH_2-Gruppen bei 2,5 und 3,45 ppm und ein austauschbares Aminproton bei 5,4 ppm erkennen.
Aus der Integration läßt sich eine Protonenverteilung von 1: 4:2:2:6 ablesen.
Lösungsmittel für die Aufnahme ist Deuterochloroform; ausgetauscht wird mit D_2O.

N-Äthoxicarbonyl-3-pyrrolidinon-2-äthylazetat (2)

39,1 gr Kalium (1,0 Mol) werden in kochendem Toluol mit einem hochtourigen Rührer (20.000 U/Min.) suspendiert. Hierzu werden unter weiterem Erhitzen gleichzeitig 189 gr von 1 (1,0 Mol) und 100 gr Acrylsäureäthylester (1,0 Mol) langsam hineindestilliert. Anschließend wird 2 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen wird mit Eiswasser extrahiert. Die wässrige Phase wird angesäuert, mit Natriumchlorid gesättigt und mit Chloroform extrahiert.
Der Rückstand der Chloroformphase wird im Vakuum destilliert.
Die Ausbeute beträgt 145,8 gr (6o % d. Th.).
$Kp_{0,5}$: 13o° C

Abb. 24:

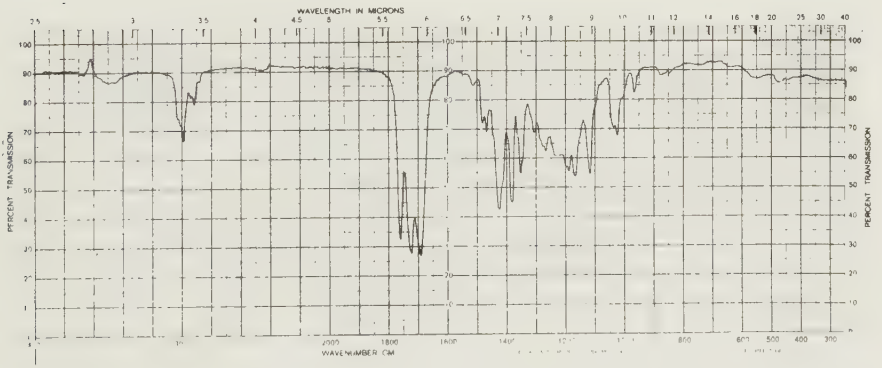
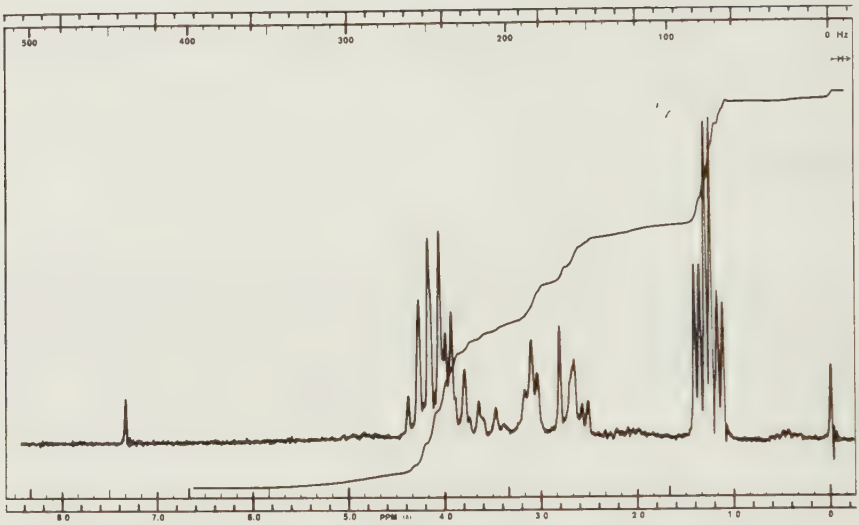


Abbildung 24 zeigt das IR-Spektrum von 2, das zum Unterschied desjenigen von 1 für das tertiäre Amin bei 35oo cm^{-1} nur noch eine breite Bande aufweist.

Die drei Adsorbtionen bei 169o, 172o und 176o cm^{-1} sind charakteristisch für N-Ester, Keton und C-Ester.

Abb. 25:



Das NMR-Spektrum von 2, das in Abbildung 25 wiedergegeben ist, zeigt analog zu dem von 1 die beiden Äthylgruppen und die beiden Methylengruppen, wobei die zweite nach 3,1 ppm verschoben ist durch das fehlende Proton am Stickstoff.

Die drei Protonen der Methylen-Methin-Gruppierung liegen teilweise unter den beiden Quartetts der Äthylpeaks.
Die Integration läßt eine Protonenverteilung von 7:2:2:6 erkennen.
Als Lösungsmittel wird Deuterochloroform verwendet.

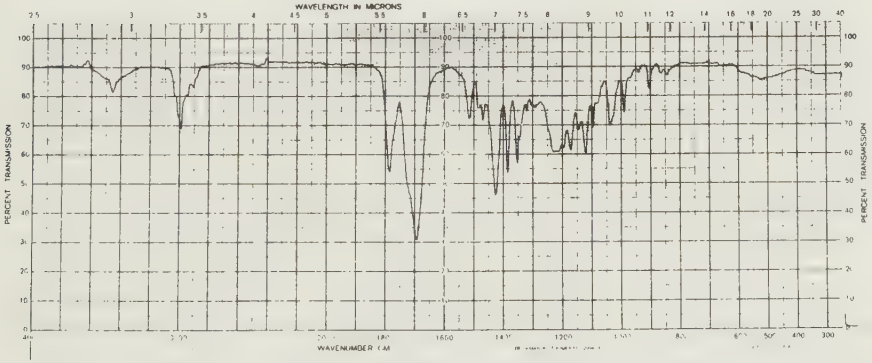
N-Äthoxicarbonyl-3-pyrrolidinol-2-essigsäure-γ-lacton (3)

243 gr von 2 (1,o Mol) werden in 1 l absolutem Äthanol gelöst und vorsichtig mit 26,46 gr Natriumborhydrid (o,7 Mol) portionsweise versetzt. Die Mischung wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend werden 18 ml Aceton zugegeben und die Lösung am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird in 1 l Wasser aufgenommen, die Lösung mit Natriumchlorid gesättigt und mit Chloroform extrahiert. Das Chloroform wird entfernt und das zurückbleibende Öl im Vakuum destilliert. Die Ausbeute beträgt 139,3 gr (7o % d. Th.).

$Kp_{o,6}$: 155^{o} C

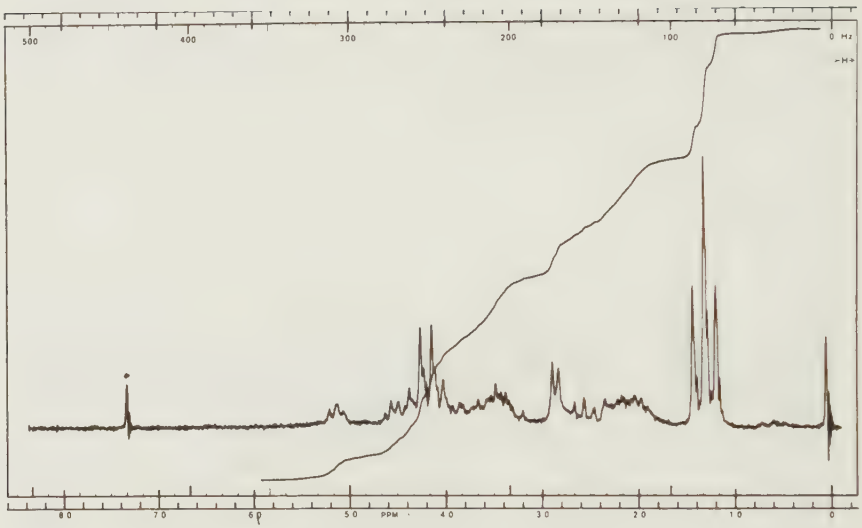
Abb. 26:



Im IR-Spektrum von 3, das aus Abbildung 26 ersichtlich ist, treten wieder wie bei 2 die Banden bei 345o cm^{-1} für den tertiären Stickstoff und bei 169o cm^{-1} für den N-Ester auf. Die Carbonylbande bei 172o cm^{-1} ist nur noch als Schulter zu erkennen.

Die Esterbande bei 176o cm^{-1} ist nun verschwunden; dafür tritt bei 1785 cm^{-1} die Lactonbande auf.

Abb. 27:



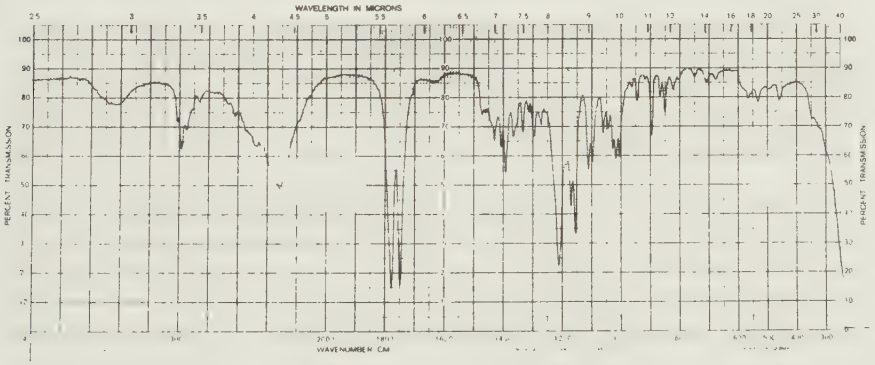
Das NMR-Spektrum von 3 - in Abbildung 27 zu sehen - zeigt wie erwartet nur noch eine Äthylgruppe und drei Methylgruppen bei 2,2, 2,9 und 3,5 ppm. Außerdem treten noch Peaks für die beiden Methinprotonen bei 4,5 und 5,1 ppm auf.
Die Protonenverteilung nach der Integration entspricht 1:1: 2:2:2:2:3.
Lösungsmittel ist Deuterochloroform.

N-Carbäthoximethyl-3-pyrrolidinol-2-essigsäure-γ-lacton (5)

199 gr Lacton 3 (1,o Mol) werden mit 294 gr Phosphorsäure (3,o Mol), die zu 2o % verdünnt wird, 3 Stunden unter Rückfluß gekocht.
Danach wird mit Soda neutralisiert und eingedampft.
Der Rückstand wird mit 167 gr Bromessigsäureäthylester (1,o Mol) und 127 gr trockenem Natriumkarbonat (1,2 Mol) in 1 l Äthanol 12 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Das Lösungsmittel wird durch Destillation entfernt, der Rückstand in Äther aufgenommen und filtriert. Unter Eiskühlung wird in die ätherische Lösung trockenes HCl-Gas eingeleitet. Der entstehende Niederschlag wird in Äther/Äthanol gereinigt und anschließend in Äthanol/Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 94,5 gr (38 % d. Th.).
Fp: 151 - 153° C

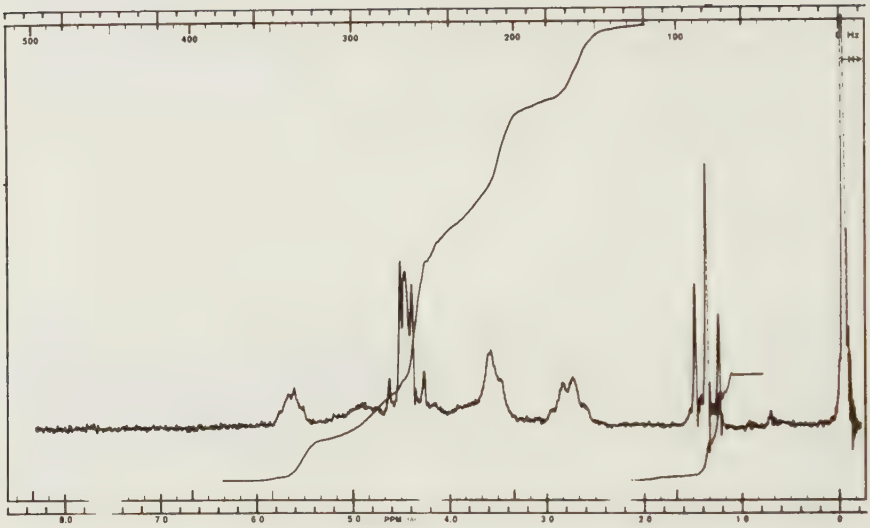
Abb. 28:



In Abbildung 28 ist das IR-Spektrum von 5 wiedergegeben. Hierdurch wird bewiesen, daß die erwartete Umsetzung eingetreten ist. Durch das Verschwinden der N-Esterbande bei 1690 cm^{-1} und das Auftreten einer C-Esterbande bei 1750 cm^{-1} wird dies offenbar.

Außerdem ist noch die Lactonbande bei 1780 cm^{-1} und die Schwingung für das tertiäre Amin bei 3450 cm^{-1} zu sehen.

Abb. 29:



Das NMR-Spektrum von 5 - aus Abbildung 29 ersichtlich - zeigt eine etwas verschobene Peaklage; dies wird durch ein anderes Lösungsmittel für die Aufnahme bedingt.
Das Triplett der Äthylgruppe liegt bei 1,3 ppm und deren Quartett bei 4,5 ppm. Unter dem letzten Signal befindet sich außerdem noch ein Peak für eine CH_2-Gruppe, wie aus der Integration zu erkennen ist. Die drei weiteren Methylengruppen liegen bei 2,8 ppm und zwei bei 3,5 ppm.
Die beiden Methinprotonen sind nach 4,9 und 5,6 ppm verschoben. Die Protonenverteilung ergibt sich aus der Integration wie 1:1:4:4:2:3.
Lösungsmittel ist in diesem Falle Trifluoressigsäure.

8-Hydroxi-1-äthoxicarbonyl-1,2-dehydropyrrolizidin (8)

24,9 gr Lacton 5 (o,1 Mol) werden in Wasser gelöst und mit wässriger Soda neutralisiert. Die Lösung wird mit Benzol extrahiert. Die Benzolphase wird getrocknet.

9,8 gr Kalium (o,25 Mol), 25 ml Äthanol und 5oo ml absolutes Benzol werden unter Rühren gekocht, bis vollständige Suspensionsbildung eingetreten ist. Überschüssiges Äthanol wird durch vorsichtige Destillation entfernt.

Zu dieser Äthylatlösung wird obige benzolische Lactonlösung gegeben und 5 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen wird mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wird eingedampft und danach zweimal mit jeweils 2oo ml Äthanol versetzt und eingedampft.

Der Rückstand wird in 8oo ml Äthanol gelöst und mit 2,27 gr Natriumborhydrid (o,o6 Mol) unter Eiskühlung portionsweise versetzt. Anschließend wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Zugabe von 1o ml Aceton wird am Rotationsverdampfer eingedampft.

Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und filtriert. Die Chloroformphase wird mit o,5 p-Toluolsulfonsäure und 8,o5 gr Äthanol (o,175 Mol) so lange am Wasserabscheider gekocht, bis kein Wasser mehr austritt.

Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand in 5oo ml absolutem Äthanol aufgenommen. Nach Zugabe von 15o gr trockenem Kupfersulfat wird 5 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Nachdem der Äthanol durch Destillation entfernt ist, wird der Rückstand in Chloroform aufgenommen und filtriert.

Die Chloroformphase wird eingedampft und das resultierende Öl destilliert. Die Ausbeute beträgt 6,9 gr (35 % d. Th.). Destillation bei o,o5 Torr; Ölbadtemperatur: 16o° C.

Abb. 3o:

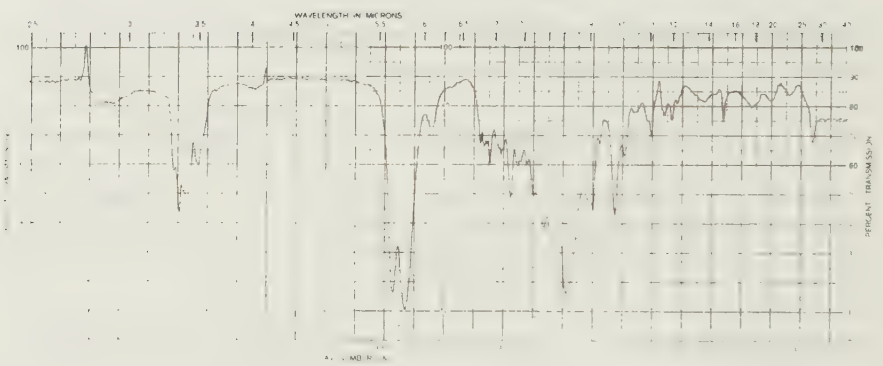


Abbildung 3o zeigt das IR-Spektrum von 8. Die wichtigsten Banden sind die der Doppelbindung bei 1645 cm^{-1} und die CO Streckschwingung des Alkohols bei 1o3o cm^{-1}. Die OH-Schwingung tritt bei 35oo cm^{-1} als Bauch auf.

Abb. 31:

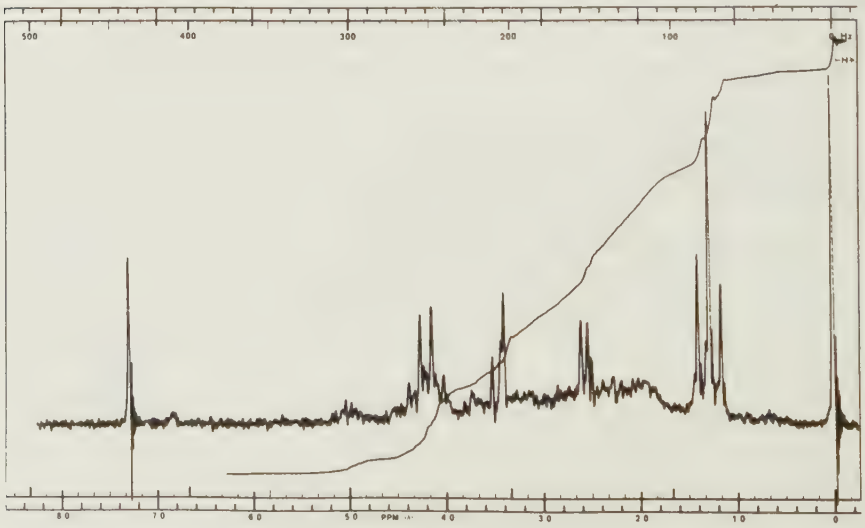


Abb. 32:

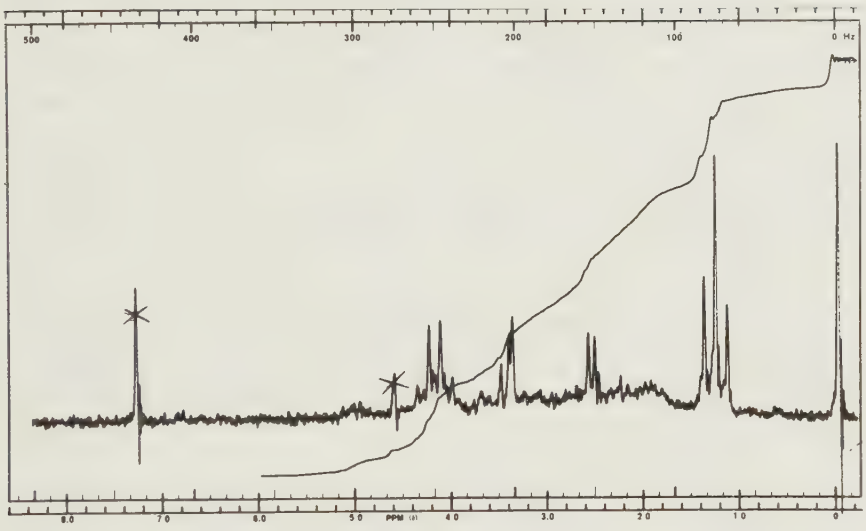


Abbildung 31 zeigt das NMR-Spektrum von 8 und Abbildung 32 dieses Spektrum nach Austausch mit D_2O.

In diesem Spektrum läßt sich wieder die Äthylgruppe und den bekannten Methinprotonpeak des C_7 erkennen. Die Äthylgruppe liegt wieder mit ihrem Triplett bei 1,15 ppm und mit ihrem Quartett bei 4,15 ppm; das C_7-Proton erscheint bei 5,1 ppm. Das Proton des sekundären Alkohols liegt bei 2,6 ppm und fällt mit einem Methylenprotonenpeak zusammen, was im ausgetauschten Spektrum zu sehen ist. Das Protonensignal des C_8 erscheint bei 3,45 ppm und das des C_2 bei 3,5-3,6 ppm. Zwei Methylengruppen weisen Peaks bei 1,9 und 2,4 ppm auf.

Die Integration läßt eine Protonenverteilung von 1:2:1:1:3:4:3 erkennen.

Lösungsmittel für die Aufnahme ist Deuterochloroform; ausgetauscht wird mit D_2O.

Retronecin (9) und Platynecin (1o)

3 gr von Ester 8 (o,o15 Mol) werden in 25 ml absolutem Äther gelöst. Diese Lösung wird tropfenweise zu o,28 gr Lithiumaluminiumhydrid (o,oo75 Mol) in 2o ml absolutem Äther gegeben. Nach beendeter Zugabe wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid wird durch Äthylazetat entfernt, die Lösung durch Kieselgur filtriert und eingedampft.
Der trockene Rückstand wird in einer Soxhletapparatur mit Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel wird durch Destillation entfernt und der verbleibende Rückstand in Äthanol/Aceton umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt o,92 gr (39,5 % d. Th.). Fp: 128 - 13o° C.

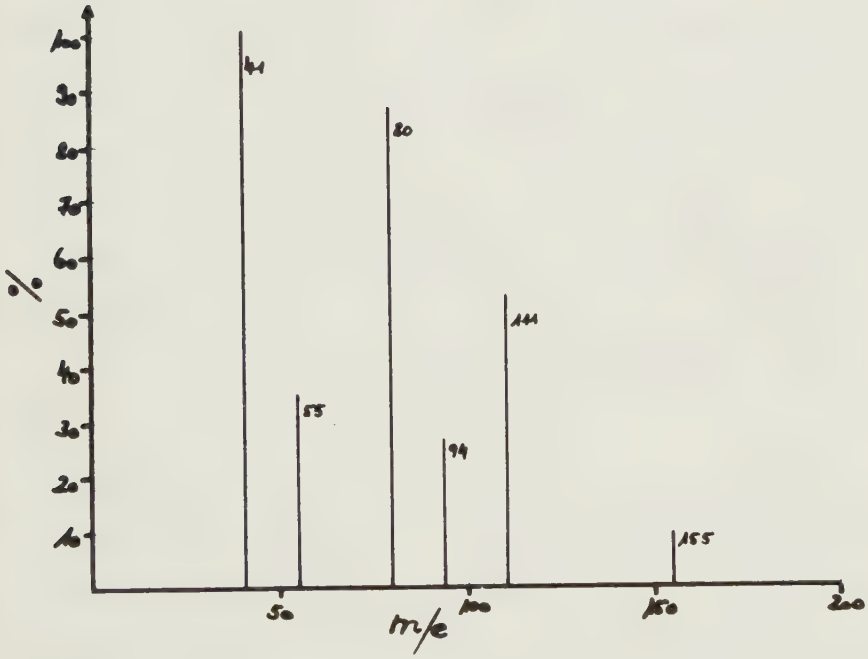
3 gr Ester 8 (o,o15 Mol) werden in 15 ml Eisessig gelöst und unter Zusatz von 1oo mg Platinoxid als Katalysator bei Normaldruck und Raumtemperatur gegen Sorbinsäure als Vergleichssubstanz hydriert.
Sobald die theoretische Menge an Wasserstoff verbraucht ist - o,o3 gr H_2 -, wird die Hydrierung abgebrochen.

Die essigsaure Lösung wird filtriert, ammoniakalisch gemacht und mit Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingedampft und der Rückstand in 2o ml absolutem Äther aufgenommen. Diese ätherische Lösung wird mit Litiumaluminiumhydrid wie oben beschrieben reduziert.
Die Ausbeute beträgt o,73 gr (3o,9 % d. Th.).
Fp: 145 - 147° C.

Die IR-, ^{1}H-NMR- und Massenspektren des synthetischen Platynecins stimmen mit denen des isolierten überein. Sie sind in den Abbildungen 7 - 1o, unter 3.1., S. 43, wiedergegeben.
Von dem Aminoalkohol Retronecin wird ein Massenspektrum angefertigt.

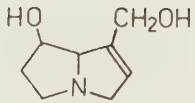
Es ist in Abbildung 33 wiedergegeben.

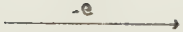
Abb. 33: MS von Retronecin

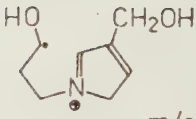


Folgende charakteristische Peaks treten auf:
m/e 155, 111, 94 und 80.

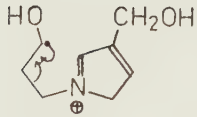
Die Zerfallsreihe ist im anschließenden Formelbild wiedergegeben.

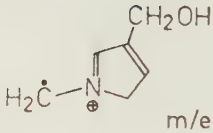




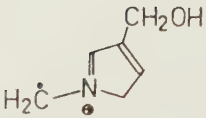


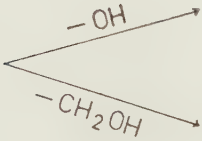
m/e 155

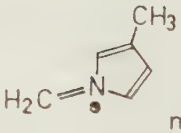




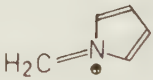
m/e 111







m/e 94



m/e 80

8. Literaturverzeichnis

1) A. Müller, Heil und Gewürzpflanzen, 7, 1 (1924)
Chem. Zentralbl., II, 1o49 (1925)

2) B. Manstein, Zentralbl., Gynaekol., 42, 1672 (1953)

3) G. P. Menschikov, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 65, 974 (1932)

4) G. Barger, T. R. Sashadri, H. E. Watt und T. Yabuta, J. Chem. Soc., 1935, 11

5) A. Orekhov und D. Liedebel, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 68, 65o (1935)

6) R. Adams und T. R. Gavindachari, J. Am. Chem.Soc., 71, 118o (1949)

7) L. B. Bull, C. C. J. Culvenor und A. T. Dick, "The Pyrrolizidine Alcaloids", North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1968

8) R. Adams und E. F. Rogers, J. Am. Chem. Soc., 63, 537 (1941)
R. Adams und K. E. Hamlin, ebenda, 64, 2597 (1942)
R. Adams und J. E. Mahan, ebenda, 64, 2588 (1942)
R. Adams, M. Carmack und J. E. Mahan, ebenda, 64, 2593 (1942)
R. Adams und N. J. Leonhard, ebenda, 66, 257 (1944)

9) G. P. Menschikov und A. D. Kuzovkov, J. Gen. Chem. USSR., 19, 17o2 (1949)

1o) V. S. Konovalov und G. P. Menschikov, Zh. Obschch. Khim., 15, 328 (1945)
Chem. Abstr., 4o, 376o (1946)

11) G. P. Menschikov und E. L. Gerevich, J. Gen. Chem. USSR., 19, 1383 (1949)

12) G. P. Menschikov, J. Gen. Chem. USSR., 16, 1311 (1946)

13) F. Galinovsky, J. Goldberger und M. Pohm, Monatsh. Chem., 8o, 55o (1949)

14) M. F. Richardson und F. L. Warren, J. Chem. Soc., 1943, 452

15) C. K. Atal, K. K. Kapur, C. C. J. Culvenor und L. W. Smith, Tetrahedron Lett., 1966 a, 537

16) E. S. Zhdanovich und G. P. Menschikov, J. Gen. Chem. USSR., 11, 835 (1941)
A. V. Danilova und R. A. Konovalova, ebenda, 2o, 1921 (1950)

17) A. V. Danilova und L. M. Utkin, Zh. Obschch. Khim., 3o, 345 (1960)
V. S. Alekseev und A. J. Ban'kovkii, Farm. Zh. (Kiev), 2o, 49 (1965)

18) S. Y. Yunusov und S. T. Akramov, Zh.Obschch. Khim., 25, 1813 (1955); 3o, 677 (1960); 3o, 683 (1960); 3o, 3132 (1960)

19) J. A. Gilruth, 11th Ann. Rept. Dept. Agr., N. Z., Div. Vet. Sci., 1903, 228/Bull. N. Z. Div. Vet. Sci., 1905, No. 9

2o) A. R. Cushny, J. Pharmacol, Exp. Ther., 2, 531 (1911)

21) R. Schoental, M. A. Head und P. R. Peacock, Br. J. Cancer, 8, 458 (1954)

22) Sedlmeier, Dahme und Schiefer, Zentralbl. Veterinaermed., VI, 854 (1959)

23) L. B. Bull, A. T. Dick und J. S. McKenzie, J. Pathol. Bacteriol., 75, 17 (1958)

24) L. B. Bull und A. T. Dick, J. Pathol. Bacteriol., 78, 483 (1959)

25) R. Schoental, Cancer Res., 28, 2237 (1968)

26) G. Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, VI. Band, 2. Hälfte, 76o

27) Manske,"The Alcaloids", Band XII (197o)

28) F. Corcilius, Planta Med., 3, 147 (1955)

29) G. Lemp, Planta Med., 21, 386 (1973)

3o) Stada-Vorschriftenbuch, Ausgabe 1973, Teil S

31) A.T. Dann, Nature (London), 186, 1o5o (196o)

32) A. R. Mattocks, J. Chromatogr., 27, 5o5 (1967)

33) L. J. Dry, M. J. Koekemoer und F. L. Warren, J. Chem. Soc., 1955, 59

34) M.E. von Klemperer und F. L. Warren, Chem. Ind. (London), 1955, 1553

35) B. Loev et al., Chem. Ind. (London), 1965, 15; 1967, 2o26

36) R. A. De Zeeuw, J. Pharm. Pharmacol., 2o, 545 (1968)

37) R. A. De Zeeuw, "Progress in Separation and Purification", Vol. 3, 1-71, Interscience N. Y., (197o)

38) R. A. De Zeeuw, Anal. Chem., 4o, 2134 (1968)

39) R. A. De Zeeuw und J. Wijsbeek, Anal. Chem., 42, 9o (197o)

4o) R. A. De Zeeuw, J. Chromatogr., 32, 43 (1968)

41) N. Neuner-Jehle et al., Monatshf. Chem., 96, 321 (1965)

42) R. M. Silverstein und G. C. Bassler, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", Second Edition, 37

43) R. M. Silverstein und G. C. Bassler, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", Second Edition, 14, 21

44) Organikum, 12. Auflage, 4o6 (1973)

45) T. A. Geissman und A. C. Waiss, J. Org. Chem., 27, 139, (1962)

46) J. W. Clark-Lewis und P. J. Mortimer, J. Chem. Soc., 196o, 189

47) a) R. Paul und G. W. Anderson, J. Am. Chem. Soc., 82, 4596 (196o)

b) H. A. Staab, Angew. Chem., 71, 194 (1959)

c) H. A. Staab, W. Rohr und A. Mannschreck, Angew. Chem., 73, 143 (1961)

d) H. A. Staab und A. Mannschreck, Chem. Ber., 95, 1284 (1962)

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn-Endenich) unter Anleitung von Herrn Professor Dr. E. Röder im August 1972 begonnen und im Juli 1975 beendet.

Für die wohlwollende Unterstützung der vorliegenden Arbeit danke ich dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn (Bonn-Endenich), Herrn Professor Dr. H.J.Roth

Ich danke der Arbeitsgruppe um Professor Frank, Chemisches Institut der Universität Münster, für die Aufnahme und die Hilfe bei der Interpretation des ^{1}H-NMR-Spektrums des Alkaloids.

Herrn Dr. Rullkötter und Herrn Lindscheid, Chemisches Institut der Universität Köln, danke ich für die Aufnahmen und Hilfen bei der Interpretation der sehr gut aufgelösten Massenspektren.

Ich danke allen Kollegen des Pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn (Bonn-Endenich), die durch Ratschläge und Tips zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beitrugen.

Dem CUSANUSWERK, Bonn-Bad Godesberg, danke ich für ein großzügig bewilligtes Stipendium.

Besonders danken möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. E. R ö d e r , der durch stete Ratschläge und wertvolle Hinweise die vorliegende Arbeit ständig förderte.

Lebenslauf

5. 1o. 1947	Geboren in Köln-Lindenthal; Vater: Hans Wiedenfeld, Mutter: Maria Wiedenfeld, geb. Merkes
1954-1958	Besuch der kath. Volksschule in Weiden/Köln
1958-1964	Besuch der Realschule Köln-Braunsfeld
1964-1966	Besuch der gymn. Aufbaustufe, Herder-Gymnasium
3. 11. 1966	Abitur
1. 12. 1966 - 3o.11. 1968	Praktikant der Robert-Koch-Apotheke in Köln-Sülz
26. 9. 1968	Pharmazeutisches Vorexamen in Köln
SS 1969 - WS 1972	Studium der Pharmazie in Bonn
11. 4. 1972	Staatsexamen in Bonn
1. 8. 1972	Beginn der vorliegenden Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn-Endenich) unter Leitung von Prof. Dr. E. Röder
18.12. 1973	Eheschließung mit Gerda Bylebyl
1. 1o. 1974	Anstellung als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten